

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LOS
ALIMENTOS



TESIS DOCTORAL

Diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal de niños prematuros

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Marta Gómez Delgado

Directores

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Leonides Fernández Álvarez
Esther A. Jiménez Quintana

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos**



DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE NIÑOS PREMATUROS

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR
Marta Gómez Delgado**

Bajo la dirección de los doctores

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Leonides Fernández Álvarez
Esther A. Jiménez Quintana

MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos**



DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DE NIÑOS PREMATUROS

Memoria que para optar al grado de
Doctor, con mención honorífica
“*Doctorado Europeus*”, presenta la
Licenciada Marta Gómez Delgado
Madrid, 2014



Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos
Facultad de Veterinaria

Ciudad Universitaria , s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3749. Fax: 91 394 37 43

JUAN MIGUEL RODRÍGUEZ GÓMEZ, LEÓNIDES FERNÁNDEZ ÁLVAREZ Y
ESTHER A. JIMÉNEZ QUINTANA, PROFESORES TITULARES DE
UNIVERSIDAD, DEL DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA Y
TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE VETERINARIA DE
LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID E INVESTIGADORA DE
PROBISEARCH S.L. (EBT-UCM)

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “ Diversidad bacteriana en el tracto gastrointestinal de niños prematuros”, de la que es autora la Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos **D^a Marta Gómez Delgado**, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección conjunta de los que suscriben y cumple las condiciones exigidas para optar al título de Doctor con mención honorífica de “*Doctorado Europeo*”.

Madrid, 22 de mayo de 2014.

Los Directores de la Tesis Doctoral,

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Leónides Fernández Álvarez

Esther A. Jiménez Quintana

A mis padres, Andrés y Teresa

A Rafa

Si no conozco una cosa, la investigaré.
Louise Pasteur

La verdadera grandeza de la ciencia acaba valorándose por su utilidad.
Gregorio Marañón

Quisiera dar las gracias a todas las personas que de una u otra manera han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

A los directores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria durante el período de realización de esta Tesis Doctoral, Lorenzo de la Hoz Perales y María Dolores Selgas Cortecero, por aceptarme en este Departamento y por la amabilidad mostrada en todo momento.

A mis directores de Tesis, por su calidad humana y porque nunca podría haber encontrado mejores mentores en el mundo de la investigación. A Juan Miguel Rodríguez, que con su conocimiento y sus buenas ideas, ha despertado en mi la curiosidad y la ambición por descubrir el porqué de las cosas. Juan, gracias por darme la oportunidad de conseguir mis metas y dejarme formar parte de este grupo. A Leónides Fernández por estar siempre ahí y sacar tiempo de debajo de la piedras para escucharme y siempre "con una gran sonrisa". Leo, agradezco tu paciencia y meticulosidad. A Esther Jiménez, que decirte, ya sabes que has sido mi pilar en todos estos años, desde maestra única en el laboratorio, hasta mejor amiga en lo personal. Esther, me has "educado" día a día en todos los aspectos, muchas gracias, aunque siempre te recordaré diciendo "Marta, me muerdo y no te educo".

A las personas que forman o que han formado parte del grupo de investigación. A María, por tu amabilidad, dulzura y cariño, gracias a ti aprendí el mundo de los gestores bibliográficos, indispensable para la realización de la Tesis. Y por supuesto, tu gran ayuda en las correcciones de última hora. A Laura, no tendría espacio suficiente para agradecerte tantas cosas... has sido mi otra mano "literalmente" en el "lab", hasta el punto de contestar cada una por el nombre de la otra, que remedio, ¿verdad? Hemos vivido los mejores y los peores momentos juntas y eso hace callo. Ha sido un placer trabajar contigo y espero que nuestra amistad perdure siempre. A tod@s l@s demás, de alguna manera habéis sido una parte muy importante de esta Tesis y de mi vida personal: Irene Espinosa (por todas esas horas de estadística e inmunología, y esas risas), Susana (siempre has tenido un beso o una sonrisa para mi), Irene Martín (por animarme siempre que estábamos juntas), Ana (por acordarte siempre de mi y mandarme un *whatsApp* a tiempo), Nivia (el sabor cubano del lab), Rebeca (esos "bichillos" que me has ayudado a identificar), Vir (mi predecesora, gracias por esa paciencia en los primeros momentos en el lab), Arantza y Toñi (nuestra división del área veterinaria de ProbiSearch), Diana, mi compi del hospi (gracias por esas largas conversaciones) y Javi (nuestro único chico, eres genial, no cambies nunca). Por supuesto a todos los alumnos de prácticas que han pasado por el laboratorio, gracias por esos descansos tan divertidos. A Susana Delgado y a Antonio Maldonado, becarios post-doctorales en mis comienzos, gracias por esos consejos tan útiles que me distéis.

A todos los profesores y becarios del Departamento. Gracias a Charo y a Pablo por su amabilidad, atenciones y consejos que siempre he apreciado. A Luis, por su gran ayuda siempre que la he necesitado. Cuando me vaya seguro que llegaré a echar de menos esas conversaciones a la hora de comer en la "cocina". En especial, a Carmen, Eva, Belén, Rosa, Lola, Carmencita y Xavi, gracias por hacer más amenos estos años en el departamento. A los becarios "de arriba", a los de ".Lab", en especial a Bea, Cris, Estefanía, Juan, Juanjo, Loreto, Sara y a los del fondo, Alicia, Eugenia, María, Miguel, Nicolette, Silvia y Violeta, gracias por los buenos momento y esas reuniones de prácticas o cenas de Navidad que hacíamos en los viejos tiempos. Y por supuesto a Alberto y Aurora por su ayuda incondicional en cualquier momento.

Igualmente me gustaría agradecer a todas las personas cuya colaboración ha sido imprescindible para el desarrollo de esta Tesis. A "mis niños" y sus familias, gracias por participar en este estudio. Al servicio de Neonatología y el Banco de Leche del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid. A Gerardo, gracias por la recogida de las muestras y la participación en este estudio durante tanto tiempo. A Queca, jefa de servicio, por su amabilidad y colaboración en todo momento. A Fernando Chaves, del Servicio de Microbiología del mismo hospital, por su colaboración. A Rosa del Campo y Merche, del hospital Ramón y Cajal, por esa temporada en vuestro laboratorio y vuestra amabilidad. Rosa me has aguantado mucho!!!

A toda la gente que conocí durante mi estancia en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Wageningen (Países Bajos). Gracias a Willem de Voss, Hauke, Susana, Clara y Jan por acogerme en su departamento, fue una experiencia maravillosa. A mi familia de Wage, Rocío, Hans, Jaime y Hansito, nunca podré olvidar ese verano, fui una más de la familia. Y a los demás de Wage en aquel verano, Juanan, Naiara, Miriam, Irene, Marta, Paula, Javi, Teresita, Vicente... gracias por hacer que me sintiera como en España.

Por último, quiero dar las gracias a todas las personas que habéis estado conmigo todos estos años, en lo bueno y en lo malo.

A mis compis de medicina, ya sabéis lo insoportable que se pone uno al hacer una Tesis Doctoral. A Alba y Clara por esas horas interminables en la biblio. A Conchi por estar ahí desde el primer día.

A Ruth y Jose. Ruth que te voy a decir que no sepas, gracias a ti estoy aquí, por ir a enterarnos de "eso" del doctorado, gracias por esos consejos y ánimos: "Todo va a salir bien, porque tú eres la lechella!". Eres una gran científica y un ejemplo a seguir para cualquiera. Jose, gracias por esas conversaciones dónde ponemos todas las cartas sobre la mesa y arreglamos el mundo en un minuto. Por supuesto no me olvido de Duna, la mejor perra del mundo, y mi antidepresivo en muchos momentos.

A mi *sister*, Rochita, gracias por ser mi alma gemela toda la vida, y escucharme aunque te cuente cosas muy aburridas. A mi prima Marta, por aguantarme siempre, aunque nunca entienda que hago siempre estudiando.

A mi familia, especialmente a mis padres por su apoyo en todo lo que hago, por vosotros soy quién soy y he llegado hasta aquí. A mi padre, persona a la que admiro profundamente, gracias por enseñarme a tener paciencia. A mi madre, gracias a ti siempre busco el lado positivo de las cosas y tu *reiki* me ha ayudado a relajarme y saber controlar el estrés. A mi hermano, Andresito, siempre tan cariñoso y preocupado por su hermanita. A Laura, no te conozco desde hace mucho y ya siento una gran complicidad contigo. A mi familia política, Viky y Ga, gracias por adoptarme como una hija y apoyarme en todo. A mis tías Cony y Mar, por "regalarme los oídos" continuamente, eso sube la moral a cualquiera. A mis abuelos y yayos, siempre conmigo.

A Rafa, es imposible agradecerte todo en unas pocas líneas... Gracias a ti soy más fuerte y he depositado una gran ilusión en nuestro futuro, juntos. Tú me conoces mejor que nadie y has celebrado conmigo mis victorias y derrotas. Ya se acaba, lo hemos conseguido!!!

Al Ministerio de Educación, Cultura y Deporte por concederme la beca predoctoral que me ha permitido realizar esta Tesis.

Espero no olvidarme de nadie. A todos vosotros... GRACIAS!!!

RESUMEN



SUMMARY

RESUMEN

Los recién nacidos (RN) pretérmino son aquellos que nacen con una edad gestacional de menos de 37 semanas. La inmadurez de estos RN prematuros requiere que se les proporcione ayuda para sobrevivir fuera del útero materno y, por ello, suelen ingresar en una unidad de cuidados intensivos neonatal (UCIN). Afortunadamente, en nuestro entorno el manejo de estos prematuros ha permitido una notable disminución de la tasa de mortalidad y morbilidad. Uno de los factores clave en el manejo de los RN prematuros es la alimentación, que debe facilitar su maduración y permitir un adecuado desarrollo. La administración de leche materna, tan pronto como sea posible, es una de las mejores opciones por los grandes beneficios que les aporta. La segunda opción es la leche materna donada por otras madres y, finalmente, si ninguna de esas dos opciones es posible, se emplea una fórmula infantil. Independientemente del tipo de leche, ésta se suele administrar a través de una sonda nasogástrica hasta que los RN alcanzan la madurez suficiente para que la puedan tomar directamente del pecho de la madre o, en su defecto, de un biberón.

Por otra parte, en los últimos años se ha confirmado el papel clave de la microbiota intestinal para la salud humana, participando, entre otras funciones, en la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos o el desarrollo del sistema inmunitario. Teniendo en cuenta que el periodo neonatal es un momento clave en la colonización intestinal y que estos RN prematuros se encuentran en un ambiente y circunstancias muy peculiares durante los primeros momentos de su vida, uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral fue estudiar el establecimiento de la microbiota intestinal en prematuros ingresados en una UCIN.

Los resultados obtenidos en relación con la diversidad microbiológica de las muestras de meconio y heces de prematuros analizadas, utilizando métodos tradicionales dependientes de cultivo y micromatrices de DNA (HITChip), revelaron una gran variabilidad interindividual. La aplicación de las técnicas dependientes de cultivo mostró que *Staphylococcus* era el género predominante en las muestras de meconio aunque, al cabo de tres semanas de ingreso en la UCIN, los microorganismos predominantes en las heces fueron los enterococos y algunas bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* y *Serratia marcescens*). En cuanto a los análisis realizados con el HITChip, las secuencias de *Bacillus* y otros *Firmicutes* fueron las que predominaron en el meconio mientras que en las muestras de heces hubo un claro predominio de las asociadas con *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Yersinia* spp. Debe destacarse que la presencia del género *Serratia* en las muestras de heces tuvo una asociación estadísticamente significativa con diversas variables relacionadas con la prematuridad de los niños.

Al evaluar la contribución de los distintos tipos de alimentación (leche materna, donada y fórmula) tras su paso por la tubuladura externa de los sistemas de alimentación enteral, se observaron diferencias en función del tipo de leche. El género *Staphylococcus* se aisló con mayor frecuencia de muestras de leche de la propia madre (91%) que de las de leche donada y fórmula (37% y 11%, respectivamente) mientras que el género *Enterococcus* estaba presente en un mayor número de muestras de leche donada y fórmula, aunque también se encontró en un alto porcentaje de muestras de leche de la propia madre. Además, se pudieron aislar algunas bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Serratia* spp.) a partir de los tres tipos de alimentación. En cambio, las bifidobacterias sólo se pudieron detectar en un pequeño porcentaje de

muestras de leche de la propia madre. Globalmente, las especies más abundantes en las muestras analizadas de heces y leche fueron *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. Por otra parte, la aplicación de técnicas de microscopía electrónica permitió observar la presencia de una biopelícula bacteriana formada por las especies bacterianas recién mencionadas en varias partes del sistema de nutrición enteral.

El análisis de las heces de esos mismos niños al cumplir dos años de edad reveló que los géneros relacionados con el ambiente hospitalario (*E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Serratia* spp.), tan abundantes en las heces de los niños durante su estancia en la UCIN, habían sido reemplazados por microorganismos propios del microbioma fecal típico de los individuos adultos sanos (grupos IV y XIVa del género *Clostridium*).

Asimismo, tanto en el meconio y en las heces de los niños durante su ingreso en la UCIN como en las muestras de heces obtenidas al cabo de los dos años se determinaron diversos parámetros inmunológicos. Los resultados mostraron una gran variabilidad de un individuo a otro, tanto en el perfil de compuestos como en sus concentraciones. En general, la concentración de la mayor parte de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas (Ig) fue inferior en las muestras de meconio que en las de heces, con excepción de MIP-1 β (proteína inflamatoria de macrófagos, del inglés *macrophage inflammatory protein 1 β*), GM-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos, del inglés *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) e IgA.

Por otra parte, entre los distintos microorganismos que pueden encontrarse en el ambiente hospitalario, las klebsiellas (y, particularmente, *K. pneumoniae*) ocupan un lugar particularmente relevante debido a su importancia como patógenos oportunistas en pacientes hospitalizados. En concreto, algunas cepas de este género son productoras de β -lactamasas de amplio espectro y se han asociado con algunos brotes nosocomiales en UCIN, con un gran impacto en la supervivencia de los RN infectados. Sin embargo, las bacterias de este género también pueden aislarse, aunque ocasionalmente y en baja concentración, de leche de mujeres sanas y de las heces de sus hijos, sugiriendo que forman parte de la microbiota natural de individuos sanos. Por ello, otro objetivo de esta Tesis Doctoral fue la caracterización de una colección de cepas del género *Klebsiella* para tratar de establecer características diferenciales entre cepas potencialmente patógenas, como las aisladas de un brote de sepsis neonatal en una UCIN, y cepas comensales aisladas de muestras de leche y heces obtenidas de individuos sanos.

La caracterización de todos los aislados del género *Klebsiella* analizados no permitió encontrar diferencias en función de la fuente de procedencia de las bacterias en cuanto a la presencia de genes que codifican diversos factores de virulencia en *K. pneumoniae*, incluyendo los relacionados con la síntesis de sideróforos (enterobactina, aerobactina y yersibactina). La única diferencia destacable que se observó fue que las cepas de *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* y *Klebsiella variicola* que se habían aislado de un brote nosocomial eran resistentes a un amplio espectro de antibióticos clínicamente relevantes. Además, algunas de las cepas aisladas de dicho brote nosocomial eran productoras de β -lactamasas de amplio espectro. Por último, dos cepas de *K. pneumoniae* producían bacteriocinas con actividad antimicrobiana frente a

otras cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. variicola*, incluyendo las causantes del brote nosocomial.

SUMMARY

Preterm infants are those born prior to the 37th week of gestation. The immaturity of these preterm infants requires providing them some help to survive outside the uterus and, therefore, they have to be admitted to a neonatal intensive care unit (NICU). Fortunately, in developed countries the management of these premature infants has allowed a marked reduction in the mortality and morbidity of preterm infants. A key factor in the management of preterm infants is feeding that should facilitate its maturation and allow for proper development. The administration of breast milk as early as possible is one of the best options due to the great benefits conferred on preterm infants. The second option is donor milk, and, finally, if none of these options is possible, infant formula is used. Regardless of the type of milk, feeding is usually given through a nasogastric tube until the preterm infant reaches sufficient maturity to breastfeed directly from the mother or, alternatively, from a bottle.

Moreover, in recent years the key role of the intestinal microbiota for human health has been confirmed, participating, among other functions, in nutrient absorption, in the development the immune system and forming a barrier against pathogens. The neonatal period is crucial for the intestinal colonization and during this first period of their life preterm infants are in special environment and circumstances. Therefore, one of the objectives of this Thesis was to study the establishment of the intestinal microbiota in preterm infants admitted to a NICU.

The results obtained when meconium and fecal samples of preterm infants were analyzed using culture-dependent techniques and DNA microarrays (HITChip) revealed a large interindividual variability for the microbial diversity. Culture-dependent techniques showed that genus *Staphylococcus* was dominant in meconium samples while *Enterococcus* and some Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*) were more abundant in fecal samples obtained during the 3th week of stay in the NICU. In relation to HITChip analyses, sequences related of *Bacillus* and other *Firmicutes* were the main bacterial groups detected in meconium while a clear predominance of sequences related to *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Yersinia* spp. was observed in feces. Interestingly, the presence of the genus *Serratia* in feces was significantly associated with several clinical variables related to prematurity.

When assessing the microbial content of different types of feed (own mother's milk, donor milk, and formula milk) after their passage through the external feeding tube of enteral feeding systems, some differences were observed depending on the type of milk. *Staphylococcus* was the genus most frequently isolated from the own mother's milk samples (93%) in contrast with the donor and formula milk (37% and 11%, respectively) samples. *Enterococcus* was most frequently found in donor and formula milk samples, although it was also found in a high percentage of own mother's milk samples. Furthermore, some Gram-negative bacteria (*E. coli*, *Klebsiella* spp. or

Serratia spp.) were also isolated from the three feed types. On the other hand, bifidobacteria could be detected only in a small percentage of own mother's milk samples. Overall, the dominant species in both preterm feces and milk samples were *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Serratia marcescens*, *K. pneumoniae*, and *E. coli*. Subsequently, scanning electron microscopy revealed the presence of a bacterial biofilm composed basically of the bacterial species cited above, in several parts of the enteral feeding systems.

The analysis of feces when the infants were 2-year-old revealed that those bacterial genera associated with the hospital environment (*E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp.), that were dominant in feces obtained during their stay at the NICU, had been replaced by genera belonging to *Clostridium* cluster IV and cluster XIVa. These two bacterial groups are dominant in the fecal microbiota of healthy adults.

The concentrations of several cytokines, chemokines, growth factors, and immunoglobulins (Ig) in meconium and fecal samples obtained in this Thesis were determined. Globally, the values obtained for all the immune factors analyzed in this study showed a high interindividual variability reflected in both detection frequencies and concentration of these immunocompounds. Meconium samples showed a lower concentration of all of them in comparison with the fecal samples, except for MIP-1 β (macrophage inflammatory protein 1 β), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) and IgA.

Bacteria of the genus *Klebsiella* (and, particularly, *K. pneumoniae*) are particularly important as opportunistic pathogens in hospitalized patients. In fact, some *Klebsiella* spp. strains produce extended spectrum β -lactamases, which have been linked to severe nosocomial outbreaks at NICU. On the other hand, some studies have shown that *Klebsiella* spp. may be a part of the normal human milk microbiota in healthy individuals where they act as a commensal, mutualistic or even potentially probiotic bacteria for the infant gut. Therefore, other objective of this Thesis was to characterize a collection of strains of the genus *Klebsiella* isolated from a neonatal sepsis outbreak in a NICU, to compare their properties with those of *Klebsiella* spp. isolated from other sources, and to search for different features enabling the distinction between potentially pathogenic and commensal strains.

No differences were found among klebsiellas from different sources regarding the presence of several genes (*magA*, *rpmA*, *wabG*, *uge*, *kfu* and *fimH*) encoding potential virulence factors of *K. pneumoniae*, including the enterobactin, aerobactin and yersibactin siderophores. However, the antibiotic susceptibility profiles of *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* and *Klebsiella variicola* strains isolated from a nosocomial outbreak were extended spectrum β -lactamases (ESBL) producers and exhibited resistance to a wide spectrum of clinically relevant antibiotics. Finally, two *K. pneumoniae* strains produced bacteriocins with antimicrobial activity against *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *K. variicola*, including those implicated in the nosocomial outbreak.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ÍNDICE	I
I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR	1
II. INTRODUCCIÓN	5
II.1 RECIÉN NACIDO PREMATURO	7
II.1.1 CONCEPTO	7
II.1.2 LAS CIFRAS DE UN GRAVE PROBLEMA	8
II.1.3 ¿POR QUÉ SE PRODUCE EL NACIMIENTO PREMATURO?	13
II.1.3.1 Partos prematuros espontáneos	13
II.1.3.2 Partos prematuros inducidos	18
II.1.4 PREVENCIÓN DEL PARTO PRETÉRMINO	19
II.1.4.1 Prevención del parto pretérmino antes del embarazo	19
II.1.4.2 Prevención del parto pretérmino durante el embarazo	26
II.1.5 PROBLEMAS A CORTO Y LARGO PLAZO ASOCIADOS A LA PREMATURIDAD	28
II.1.6 MANEJO DE LOS NIÑOS PREMATUROS: ALIMENTACIÓN	33
II.1.6.1 Lactancia materna	35
II.1.6.2 Leche materna donada	39
II.1.6.3 Fortificantes de la leche humana	42
II.1.6.4 Fórmulas infantiles	44
II.1.6.5 Nutrición parenteral y enteral	44
II.1.6.6 Monitorización del crecimiento y la ganancia ponderal	46
II.2 LA MICROBIOTA INTESTINAL	48
II.2.1 EL INTESTINO, UN ÓRGANO PECULIAR	48
II.2.2 DIVERSIDAD DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	50
II.2.3 ADQUISICIÓN Y EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL INFANTIL	52
II.2.3.1 Periodo fetal	53
II.2.3.2 Nacimiento y periodo posnatal	54
II.2.4 RELEVANCIA DE LA ADQUISICIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	55
II.2.5 MICROBIOTA INTESTINAL E INFECCIONES DEL NIÑO PREMATURO	58
II.3 EL GÉNERO <i>KLEBSIELLA</i>	63
II.3.1 <i>KLEBSIELLA</i> E INFECCIONES NOSOCOMIALES	63
II.3.2 B- LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEE) EN EL GÉNERO <i>KLEBSIELLA</i>	63
II.3.3 FACTORES DE VIRULENCIA	65
III. COLONIZACIÓN INTESTINAL EN LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS: EFECTO DE LAS SONDAS DE ALIMENTACIÓN ENTERAL	69
III.1 ABSTRACT	71
III.2 INTRODUCTION	72
III.3 METHODS	73
III.3.1 SUBJECTS AND SAMPLING	73
III.3.2 CULTURE ANALYSIS OF THE SAMPLES AND BACTERIAL IDENTIFICATION	73

III.3.3 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM) ANALYSIS	74
III.3.4 STATISTICAL ANALYSIS	74
III.4 RESULTS	75
III.4.1 CHARACTERISTICS OF THE INFANTS	75
III.4.2 MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF OWN MOTHER'S MILK, DONOR HUMAN MILK AND PRETERM FORMULA AFTER THEIR PASS THROUGH ENTERAL FEEDING TUBES	75
III.4.3 SEM ANALYSIS OF THE NASOGASTRIC ENTERAL FEEDING TUBES	76
III.4.4 CULTURE ANALYSIS OF THE MECONIUM AND FECAL SAMPLES	76
III.5 DISCUSSION	78
III.6 REFERENCES	81

IV. DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL MECONIO DE RECIÉN NACIDOS PREMATUROS Y EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA FECAL DURANTE EL PRIMER MES DE VIDA

99

IV.1 ABSTRACT	101
IV.2 INTRODUCTION	102
IV.3 MATERIAL AND METHODS	103
IV.3.1 PATIENTS AND SAMPLING	103
IV.3.2 ETHICS STATEMENT	103
IV.3.3 CULTURE ANALYSIS OF THE SAMPLES	103
IV.3.4 BACTERIAL GENOTYPING AND IDENTIFICATION	104
IV.3.5 DNA EXTRACTION FROM MECONIUM AND FECES	104
IV.3.6 PCR AMPLIFICATION AND DENATURING GRADIENT GEL ELECTROPHORESIS (PCR-DGGE)	105
IV.3.7 HUMAN INTESTINAL TRACT CHIP (HITCHIP) ANALYSIS	105
IV.3.8 STATISTICAL ANALYSIS	106
IV.4 RESULTS	107
IV.4.1 CHARACTERISTICS OF THE INFANTS	107
IV.4.2 CULTURE ANALYSIS OF THE MECONIUM AND FECAL SAMPLES	107
IV.4.3 PCR-DGGE ANALYSIS	108
IV.4.4 HITCHIP ANALYSIS	109
IV.4.5 COMPARISON BETWEEN THE RESULTS OBTAINED BY CULTURES AND HITCHIP	110
IV.5 DISCUSSION	112
IV.6 REFERENCES	115

V. PERFIL BACTERIOLÓGICO E INMUNOLÓGICO DEL INTESTINO DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO: SEGUIMIENTO DURANTE 2 AÑOS

149

V.1 SUMMARY	151
V.2 INTRODUCTION	152
V.3 METHODS	153
V.3.1 PATIENTS AND SAMPLING	153
V.3.2 HUMAN INTESTINAL TRACT CHIP (HITCHIP) ANALYSIS	153
V.3.3 IMMUNOLOGICAL ANALYSIS	154
V.3.4 STATISTICAL ANALYSIS	154
V.4 RESULTS	156
V.4.1 CHARACTERISTICS OF THE INFANTS	156
V.4.2 HITCHIP ANALYSIS	156

V.4.3 IMMUNOLOGICAL ANALYSIS	157
V.5 DISCUSSION	159
V.6 REFERENCES	161
<u>VI. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE <i>KLEBSIELLA</i> SPP. PROCEDENTES DE CASOS HOSPITALARIOS Y MECONIO, HECES Y LECHE MATERNA DE HUÉSPEDES SANOS</u>	<u>177</u>
VI.1 ABSTRACT	179
VI.2 BACKGROUND	180
VI.3 METHODS	181
VI.3.1 BACTERIAL STRAINS AND GROWTH CONDITIONS	181
VI.3.2 IDENTIFICATION OF ISOLATES	181
VI.3.3 PLASMID DNA ISOLATION	181
VI.3.4 GENETIC RELATEDNESS AND PHYLOGENETIC ANALYSIS	182
VI.3.5 ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING AND SCREENING FOR EXTENDED-SPECTRUM BETA-LACTAMASE	182
VI.3.6 VIRULENCE DETERMINANTS	183
VI.3.7 BIOFILM AND SIDEROPHORES ASSAYS	183
VI.3.8 ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ISOLATES	183
VI.4 RESULTS	184
VI.4.1 IDENTIFICATION OF ISOLATES	184
VI.4.2 GENETIC DIVERSITY AND PHYLOGENETIC ANALYSIS	184
VI.4.3 PLASMID PROFILING	185
VI.4.4 ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY	185
VI.4.5 VIRULENCE DETERMINANTS AND BIOFILM FORMATION ABILITY	185
VI.4.6 ANTIMICROBIAL ACTIVITY	185
VI.5 DISCUSSION	187
VI.6 CONCLUSIONS	190
VI.7 REFERENCES	191
<u>VII. DISCUSIÓN</u>	<u>207</u>
VII.1 COLONIZACIÓN INTESTINAL DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS	209
VII.1.1 MICROBIOTA DE LA ALIMENTACIÓN RECIBIDA POR LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS	212
VII.1.2 EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS: SEGUIMIENTO A LOS 2 AÑOS DE EDAD	215
VII.2 <i>KLEBSIELLAS</i> SPP.: DE COMENSAL A PATÓGENO OPORTUNISTA	218
VII.3 PREVENCIÓN DE INFECCIONES EN NIÑOS PREMATUROS MEDIANTE LA MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA MATERNO-INFANTIL: DE LOS PROBIÓTICOS A LAS MICROBIOTAS SINTÉTICAS	223
<u>VIII. CONCLUSIONES</u>	<u>227</u>
<u>IX. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>231</u>
<u>X. RESUMEN AMPLIADO¹</u>	<u>267</u>

X.1 INTRODUCCIÓN	269
X.2 OBJETIVOS	273
X.3 METODOLOGÍA	274
X.4 RESULTADOS	279
X.5 DISCUSIÓN	281
X.6 CONCLUSIONES	284
X.7 BIBLIOGRAFÍA	285
<u>XI. EXTENDED ABSTRACT²</u>	<u>293</u>
XI.1 INTRODUCTION	295
XI.2 OBJECTIVES	299
XI.3 MATERIAL AND METHODS	300
XI.4 RESULTS	305
XI.5 DISCUSSION	307
XI.6 CONCLUSIONS	310
XI.7 REFERENCES	311
<u>XII. APÉNDICES</u>	<u>319</u>
XII.1 LISTADO DE TABLAS	321
XII.2 LISTADO DE FIGURAS	322

I. EXPOSICIÓN GENERAL DEL PROBLEMA A INVESTIGAR

El proceso de adquisición de la microbiota al principio de la vida posee efectos a corto, medio y largo plazo sobre nuestra salud, ya que cada vez es más evidente que el riesgo de sufrir diversas enfermedades a lo largo de la vida aumenta o disminuye dependiendo de cómo se desarrolle (El Aidy et al., 2013; Fouhy et al., 2012; Renz et al., 2012; Sim et al., 2013; Stockinger et al., 2011; Weng y Walker, 2013; White et al., 2013). En general, se considera que el prototipo ideal de microbiota gastrointestinal durante el periodo infantil es la existente en los niños sanos, nacidos por parto vaginal tras un embarazo a término sin ninguna complicación, que no han recibido medicación y que se han alimentado con leche de la propia madre (Penders et al., 2006). Sin embargo, este estándar de colonización puede verse alterado por numerosos factores, incluyendo la base genética y epigenética del hospedador, su edad gestacional, el tipo de parto, la forma de alimentación, el ambiente en el que reside o el uso de antibióticos y otros medicamentos (Adlerberth y Wold, 2009; Fanaro et al., 2003).

En este sentido, los niños prematuros tienen una experiencia postnatal muy distinta, en general, de la de los nacidos a término. Tienen una edad gestacional y peso inferior, en muchas ocasiones nacen tras rotura prematura o prolongada de membranas, suelen recibir antibióticos y otros medicamentos, están inmersos en un ambiente hospitalario durante periodos relativamente prolongados, tienen retrasado el inicio de la alimentación enteral (y, cuando se inicia, puede no ser con la leche de la propia madre), poseen una barrera gástrica alterada y, con cierta frecuencia, sus madres han sufrido infecciones o disbiosis microbianas en la cavidad oral, tracto gastrointestinal o en el ámbito genitourinario durante el embarazo (Dial, 2009). Todos estos factores conducen a una alteración en el establecimiento de la microbiota intestinal, que se ha llegado a describir como aberrante. Este hecho aumenta el riesgo de sufrir infecciones que, en ocasiones, pueden dejar secuelas a medio y largo plazo, e impide la correcta maduración del sistema inmunitario. Los estudios enfocados en este tema han sido escasos hasta el momento pero se espera que aumenten notablemente en los próximos años debido a su indudable importancia científica y clínica (<http://www.efcni.org/>).

En este contexto, los objetivos de la Tesis Doctoral han sido los siguientes:

1. Determinar la diversidad bacteriológica y diversos parámetros inmunológicos en el meconio y las heces de los niños prematuros durante el tiempo que permanecen en la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) y, posteriormente, a los dos años de edad, empleando una combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo.
2. Conocer la influencia de los sistemas de alimentación enteral en la colonización intestinal de los niños prematuros durante su estancia en la UCIN.
3. Caracterizar una colección de cepas del género *Klebsiella* aisladas de un brote de sepsis neonatal en una UCIN y comparar sus propiedades con las de *klebsiellas* aisladas de otros orígenes. Tratar de establecer características diferenciales entre cepas potencialmente patógenas y cepas comensales.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 RECIÉN NACIDO PREMATURO

II.1.1 Concepto

La duración del embarazo se considera normal cuando el parto se produce entre las semanas 37 y 42 de gestación (*“parto a término”*). Cuando el niño nace antes de las 37 semanas se le llama *“prematureo”* o *“pretérmino”* (Organización Mundial de la Salud, (OMS, 1977)), términos que aunque poseen matices distintos, se utilizan indistintamente en la práctica. En general, los órganos y sistemas (respiración, control de temperatura, digestión, metabolismo, etc.) del niño prematuro son inmaduros en comparación con los del niño a término, por lo que necesitan apoyo adicional para sobrevivir fuera del útero materno y, en consecuencia, suelen ingresar en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN).

Según su edad gestacional (EG), los niños prematuros se clasifican en varios grupos:

(a) Prematuros moderados o tardíos: aquellos nacidos entre las 32 y 37 semanas; representan el 84% del total de nacimientos prematuros (aproximadamente 12,5 millones de niños al año). En los países desarrollados, la mayoría sobrevive con medidas de atención de apoyo.

(b) Muy prematuros: aquellos nacidos entre las 28 y 32 semanas. En nuestro entorno, estos RN requieren un apoyo mayor pero la mayoría también sobrevive.

(c) Extremadamente prematuros: los nacidos antes de las 28 semanas. Estos neonatos requieren la atención más intensiva y costosa para sobrevivir. En los países desarrollados, tienen un 90% de posibilidades de supervivencia, aunque pueden sufrir discapacidades físicas, neurológicas y de aprendizaje. En países en vías de desarrollo, sólo el 10% sobrevive.

Conviene añadir que el riesgo de muerte de los recién nacidos a término entre las 37 y 39 semanas de gestación es dos veces más alto que aquellos recién nacidos (RN) a partir de las 39 semanas de EG. Por este motivo, es importante garantizar que, siempre que sea médicamente posible, los RN tengan al menos 39 semanas de gestación en el momento de nacimiento.

Otro parámetro que se utiliza habitualmente para clasificar a estos niños es su peso al nacimiento (PN), existiendo prematuros cuyo PN es bajo ($PN < 2.500$ g), muy bajo (< 1.500 g) o extremadamente bajo (< 1.000 g). La gravedad de los problemas que presentan estos niños suele ser mayor cuanto menores son la EG y el PN, por lo que ambos parámetros son relevantes en la práctica. Por otra parte, hay neonatos que, independientemente de nacer a término o pretérmino, son *“pequeños para su edad gestacional”*. El crecimiento intrauterino retardado (CIR) es la causa más frecuente de bajo peso al nacer (BPN) en los países en vías de desarrollo, mientras que la prematuridad lo es en los países desarrollados.

La Figura 1 muestra de una forma gráfica el concepto de prematuridad y otros relacionados con el resultado de un embarazo.

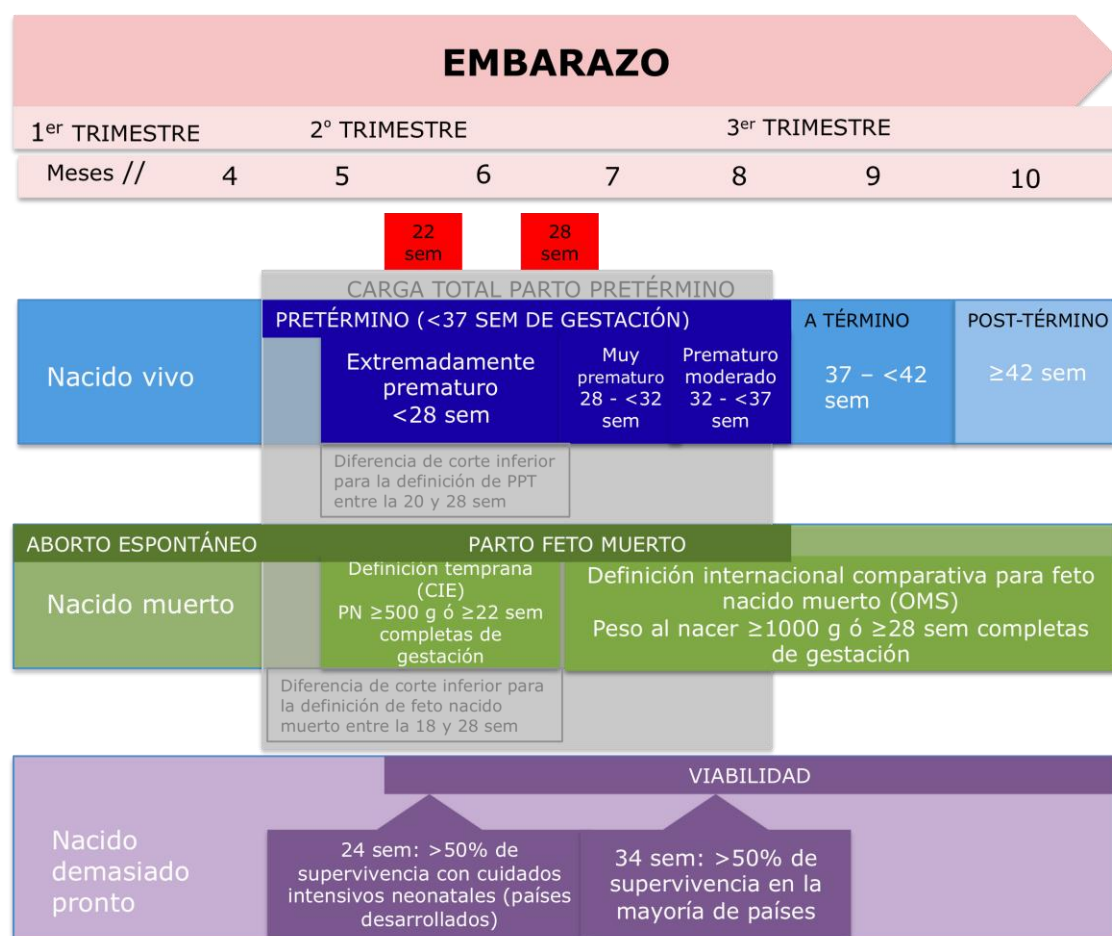


Figura 1. Resumen de los distintos conceptos de prematuridad y otros relacionados con el resultado del embarazo. Fuente: OMS, 2012.

CIE, Clasificación Internacional de Enfermedades; OMS, Organización Mundial de la Salud; PPT, parto pretérmino.

II.1.2 Las cifras de un grave problema

Cada año, unos 15 millones de RN en el mundo (>10% de los nacimientos), nacen demasiado pronto, según el reciente informe “*Nacido Demasiado Pronto: Informe de Acción Global sobre Nacimientos Prematuros*” (OMS, 2012) (Figura 2 A y B). Más de un millón de estos niños mueren poco después del nacimiento; muchos otros sufren algún tipo de discapacidad física, neurológica o educativa, a menudo con un elevado coste para las familias y la sociedad (Blencowe et al., 2012b). De hecho, la prematuridad constituye la primera causa de mortalidad en el primer mes de vida y la segunda (tras la neumonía) entre los niños menores de 5 años (Liu et al., 2012).

Las cifras del informe citado anteriormente muestran la magnitud del problema así como las disparidades entre países. De los 11 países con índices de nacimientos prematuros mayores al 15%, todos menos 2 están en África Subsahariana (Tabla 1). Pero el problema de los nacimientos prematuros no se limita a los países de bajos ingresos ya que, por ejemplo, Estados Unidos y Brasil están entre los 10 países con mayor número de nacimientos prematuros (Tabla 1).

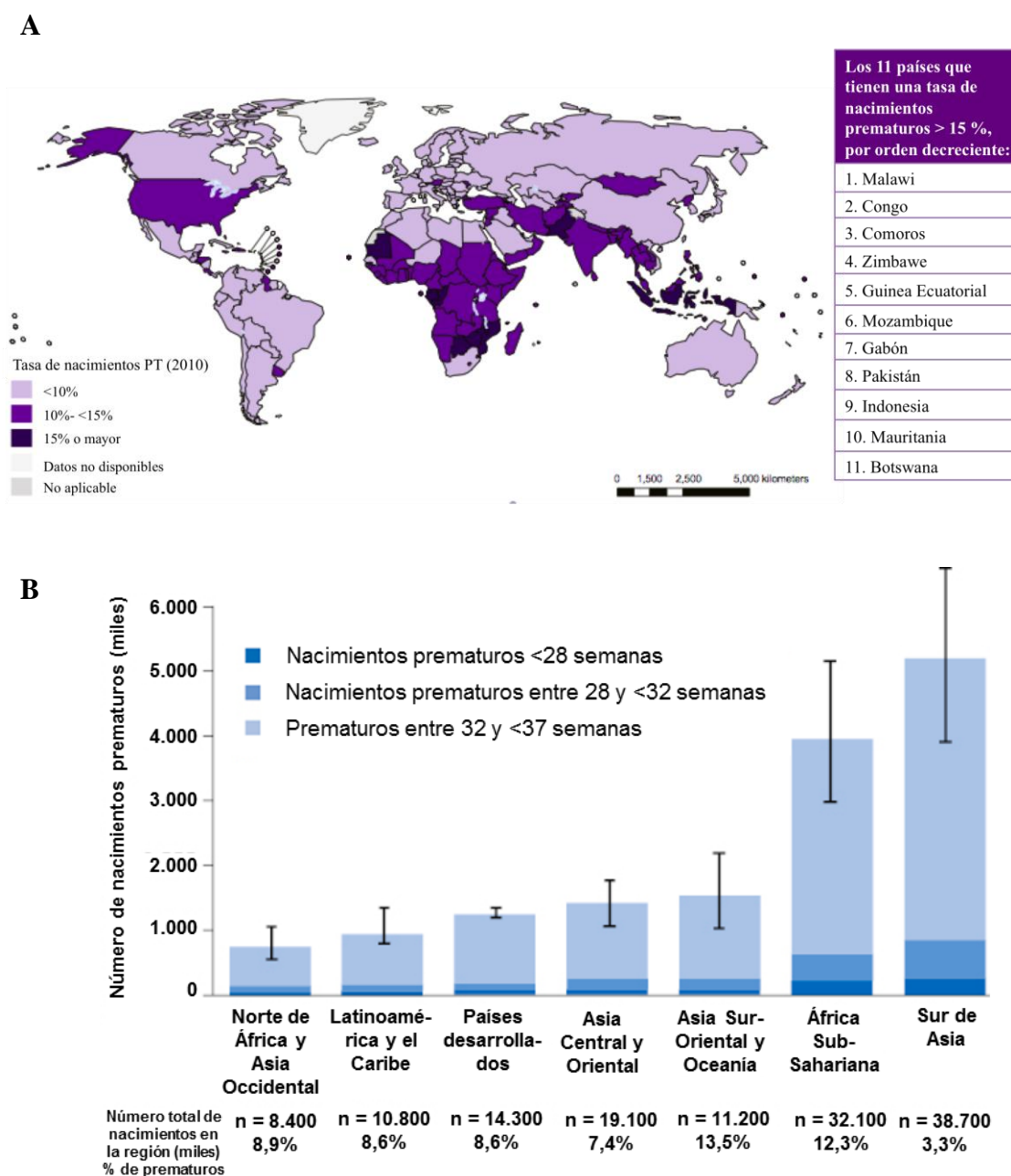


Figura 2. Tasa de nacimientos prematuros (PT) en el año 2010. A) Los 11 países con mayor tasa de prematuridad. B) Por edad gestacional y país. Fuente: OMS, 2012.

En Europa, la tasa de prevalencia de partos pretérmino (PPT) oscila entre un 5,5% (Irlanda) y un 11,4% (Austria) de todos los neonatos, con una media del 7,1%, según el informe *EU Benchmarking Report* (<http://www.efcni.org>) publicado por la Fundación Europea para el Cuidado de los Neonatos (*European Foundation for the Care of Newborns Infants*, EFCNI). Este informe, presentado por primera vez en el Parlamento Europeo el 6 de mayo de 2010 y actualizado en noviembre de 2011, revela el impacto de la prematuridad en 14 países europeos (Austria, Bélgica, República

Checa, Dinamarca, Francia, Alemania, Italia, Irlanda, Holanda, Polonia, Portugal, España, Suecia y Reino Unido) y muestra una preocupante falta de iniciativas políticas nacionales y europeas para prevenir el PPT y mejorar la calidad del cuidado de los RN prematuros. El informe también muestra que el número de nacimientos prematuros ha aumentando en Europa. Por ejemplo, la prematuridad aumentó en Portugal un 32% durante el período 2004 - 2008 (de 6,8% en 2004 al 9,0% en 2008); en Austria se registró un aumento similar del 8,1% en 1991 al 11,1% en 2008 y en España el número de RN prematuros pasó de 17.000 casos en 1997 a 40.281 en 2007. En el Reino Unido el número de nacimientos extremadamente prematuros aumentó en un 30% entre 1995 y 2006. Sobre la base de las conclusiones del informe, se plantearon cuestiones importantes a tener en cuenta para las políticas futuras de la Unión Europea (UE). Entre ellas, la UE debería:

1. Reconocer el creciente desafío de la prematuridad en Europa y su impacto significativo en la morbilidad y mortalidad infantil y reconocer las desigualdades sociales y de salud relacionadas con la prematuridad que existen entre los estados miembros de la UE. La salud de los prematuros está actualmente ausente en el desarrollo de políticas de salud y sociales de la UE, una observación sorprendente dada la prevalencia y el aumento de los partos prematuros y sus complicaciones en Europa.

2. Demostrar el compromiso de la UE para mejorar la salud neonatal a través del desarrollo e implementación de las políticas sanitarias y sociales coordinadas dentro de la UE. La UE tiene un papel esencial que desempeñar en la mejora de la salud neonatal en Europa.

3. Dar prioridad y destinar fondos de la UE para promover la investigación destinada a mejorar la prevención, el tratamiento y la atención de los nacimientos prematuros y apoyar el establecimiento de redes europeas. Incluir la perinatología y la neonatología como áreas prioritarias clave de la investigación en salud financiada por la UE.

Actualmente en España, uno de cada 13 niños nace antes de las 37 semanas de gestación, representando la causa del 75% de ingresos de neonatos en los hospitales españoles, según los datos presentados por la Asociación Española de Pediatría (AEP) en una reciente nota de prensa (www.aeped.es/noticias/nota-prensa-sobre-ninos-prematuros; 21 de noviembre de 2013).

Los nacimientos prematuros deberían ser una prioridad para la Salud Pública en los países desarrollados, debido a su elevada prevalencia, al impulso que este tema ha recibido por parte del personal médico y al indudable impacto emocional y económico asociado. En estos países, la mejora del cuidado de los prematuros condujo al desarrollo de la neonatología como una subespecialidad médica y al establecimiento de las UCIN. En Estados Unidos, por ejemplo, cerca del 12% de los niños nacidos en 2010 fueron prematuros, una tasa que ha aumentado en un 30% desde 1981 (Miniño y Murphy, 2012). Además, se trata de un problema que lleva aparejado un coste económico importante. En ese mismo país, el coste económico anual asociado con el PPT fue de más de 26.200 millones de dólares (51.600 \$ por niño) en el año 2005. Durante ese mismo año, el coste médico medio (incluyendo atención hospitalaria y ambulatoria) durante el primer año de vida fue 10 veces mayor para los prematuros (32.325 \$) que para los RN a término (3.325 \$). La estancia media en el hospital fue nueve veces más prolongada para un RN prematuro (13 días) que para un RN a

término (1,5 días) (*Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes*, 2007). Los gastos para los padres son también notablemente mayores en el caso de nacimientos prematuros.

Tabla 1. Países con el mayor número de nacimientos prematuros y con las mayores tasas de nacimientos prematuros en el año 2010. Comparación con la situación en España.

Número de nacimientos prematuros		Tasa de nacimientos prematuros (por cada 100 nacimientos)	
País	Número	País	Tasa
India	3.519.100	Malawi	18,1
China	1.172.300	Comoras	16,7
Nigeria	773.600	Congo	16,7
Pakistán	748.100	Zimbabue	16,6
Indonesia	675.700	Guinea Ecuatorial	16,5
Estados Unidos	517.400	Mozambique	16,4
Bangladesh	424.100	Gabón	16,3
Filipinas	348.900	Pakistán	15,8
R. D. Congo	341.400	Indonesia	15,5
Brasil	279.300	Mauritania	15,4
España	37.100	España	7,4

Fuente: OMS (2012), incluye datos de 193 países.

Como se ha comentado, el PPT también suele estar acompañado de un coste emocional y económico para las familias, incluyendo la pérdida de oportunidades sociales y laborales, a lo que se suma una mayor dificultad para mantener el empleo (Cronin et al., 1995; Macey et al., 1987; Saigal et al., 2000; Singer et al., 1999; Taylor et al., 2001). A menudo, el nacimiento y la hospitalización de los niños prematuros están asociados con distrés y depresión maternal, paternal y/o familiar (Davis et al., 2003; Eisengart et al., 2003; Singer et al., 2003); el nivel de estrés es mucho mayor en el caso de niños de muy bajo o extremadamente bajo peso al nacer, incluyendo percepciones de menor competencia parental y una mayor dificultad para establecer apego con el niño (Taylor et al., 2001). No obstante, ciertas mejoras, como la extensión del método canguro (del que se hablará posteriormente), pueden mejorar significativamente la situación. Por otra parte, el cuidado de un niño prematuro puede contribuir a reforzar los lazos familiares (Saigal et al., 2000) (Figura 3).

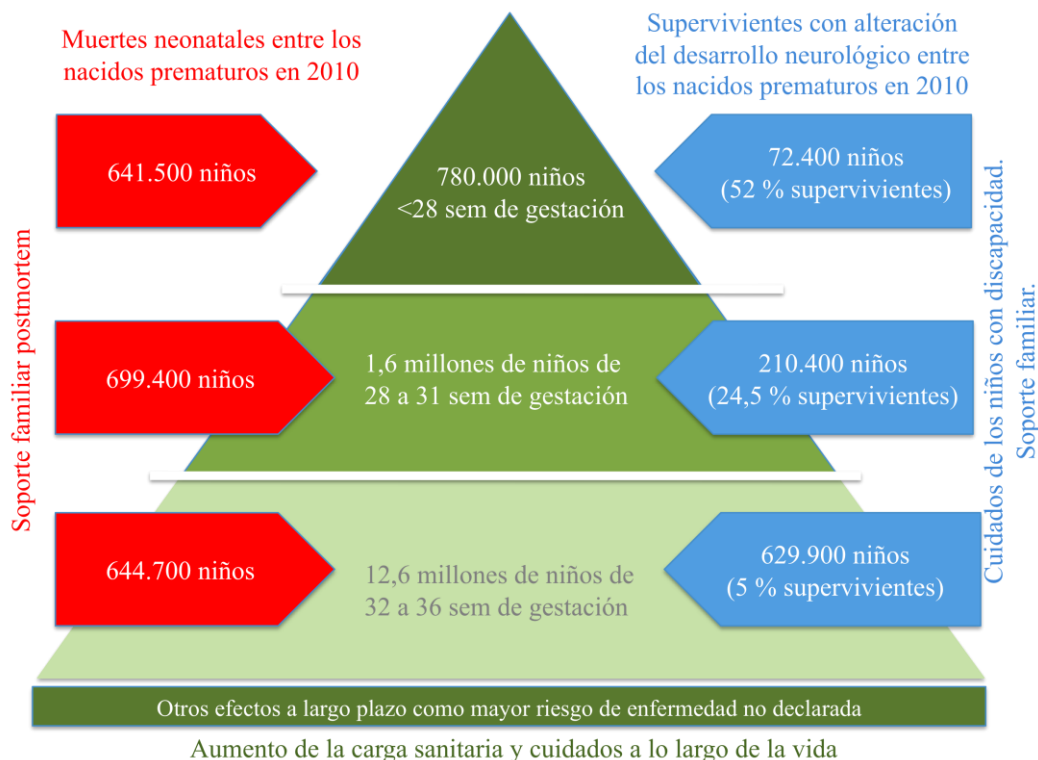


Figura 3. Tasa de mortalidad regional y de discapacidad en 15 millones de prematuros nacidos en el año 2010. Fuente: OMS, 2012.

En países en vías de desarrollo o subdesarrollados, existen mitos e ideas preconcebidas (y erróneas) que han contribuido a restringir la implementación de intervenciones necesarias para reducir el nacimiento pretérmino y para mejorar la tasa de supervivencia y el estado de salud de los prematuros a corto, medio y largo plazo (OMS, 2012). El primer mito es que los PPT no suponen un problema importante para la Salud Pública en dichos países, posiblemente debido a la ausencia de datos que muestren el coste de la prematuridad y de las incapacidades asociadas. En segundo lugar, en estos mismos países se tiende a pensar que el cuidado efectivo de las madres de elevado riesgo y de los niños prematuros requiere las mismas intervenciones caras y tecnológicamente avanzadas que son comunes en los países desarrollados y que están fuera del alcance de sus presupuestos sanitarios. Sin embargo, existe todo un abanico de intervenciones de bajo coste, tales como el método de la madre canguro o el empleo prenatal de corticoides, que si se implementaran de forma sistemática podrían reducir las tasas de mortalidad y morbilidad de forma inmediata y sustancial en los países más afectados. Estas acciones son posibles y asequibles en zonas con grandes restricciones económicas y con una infraestructura sanitaria rudimentaria (Howson et al., 2012).

En casi todos los países con datos contrastados, las tasas de PPT han permanecido constantes o han crecido en los últimos años; un hecho que, unido al incremento de la población, significa un mayor número de prematuros cada año (Blencowe et al., 2012b; Chang et al., 2013). A este hecho también ha contribuido, en los países desarrollados, el aumento de neonatos con edades gestacionales extremadamente bajas (24-26 semanas), con un 80% de supervivencia para los nacidos a las 25 semanas (Blencowe et al., 2012b). En este sentido, a pesar de la reducción en

el riesgo de secuelas en prematuros europeos de cualquier EG, el número absoluto de supervivientes con parálisis cerebral no ha cambiado debido al aumento de la supervivencia de los niños más prematuros (EG <26 semanas) (Moore et al., 2012; Platt et al., 2007).

II.1.3 ¿Por qué se produce el nacimiento prematuro?

La frecuencia de PPT no ha disminuido en los últimos años y eso puede asociarse, en parte, a la aparición de situaciones de riesgo como son la mayor edad de las madres y el uso cada vez más frecuente de técnicas de reproducción asistida que se asocian a una mayor probabilidad de gestación múltiple. Aunque hay algunos factores que se relacionan con una mayor probabilidad de PPT, también es cierto que muchos de los niños que nacen prematuramente no tienen ninguno de esos antecedentes; una madre joven, sin problemas médicos importantes y con un embarazo controlado puede tener un PPT. En consecuencia, es necesario realizar investigaciones que ayuden a conocer los factores que causan o predisponen a un PPT. La identificación de los factores de riesgo del PPT antes de la concepción o al comienzo del embarazo podría ayudar a prevenir esta complicación aplicando las intervenciones adecuadas.

En general, los nacimientos prematuros pueden dividirse en dos grandes categorías: aquellos que son espontáneos por inicio precoz del parto o ruptura prematura de las membranas y aquellos que son inducidos por el personal médico (Goldenberg et al., 2012) (Tabla 2 y Figura 4).

II.1.3.1 Partos prematuros espontáneos

Se suele considerar que el PPT espontáneo es un proceso multifactorial, aunque su causa última permanece desconocida hasta en un 50% de los casos (Menon, 2008). A continuación, se describen brevemente los principales factores conocidos hasta la fecha.

En primer lugar, deben mencionarse los antecedentes maternos. El hecho de que una mujer haya sido prematura o haya tenido hijos prematuros constituye un fuerte factor de riesgo (Ananth et al., 2006; Bhattacharya et al., 2010; Bloom et al., 2001; Esplin et al., 2008) que, muy probablemente, esté asociado, a su vez, a factores de riesgo genéticos y epigenéticos (Plunkett y Muglia, 2008). La edad de la madre también marca una diferencia significativa en las posibilidades de tener un parto prematuro, siendo el riesgo más alto en mujeres muy jóvenes o muy mayores. Por ejemplo, la tasa de nacimientos prematuros en Estados Unidos es del 11 - 12% para las mujeres entre 20 y 35 años, mientras que es mayor del 15% para las mujeres menores de 17 años o mayores de 40 años (OMS, 2012).

Tabla 2. Tipos de partos prematuros y factores de riesgo asociados. Intervenciones realizadas para la prevención de cada uno de ellos.

Tipo	Factores de riesgo	Ejemplos	Intervenciones
Parto prematuro espontáneo	Edad de la gestante y tiempo entre embarazos	Embarazos en adolescentes Madres añosas Intervalos cortos entre embarazos	Prevención de la preconcepción (incluyendo programas de planificación familiar en la adolescencia y también entre embarazos)
	Embarazo múltiple	Embarazo gemelar Embarazos por reproducción asistida	Mejora de la práctica en la reproducción asistida
	Infección	Infección urinaria Malaria VIH Sífilis Vaginosis bacteriana	Programas de educación sexual para la prevención y el tratamiento de estas infecciones antes del embarazo Aplicación de intervenciones específicas para el diagnóstico precoz y el tratamiento de las infecciones que sucedan durante el embarazo
	Enfermedad médica crónica materna subyacente	Diabetes HTA Anemia Asma Enfermedad tiroidea	Mejorar el control antes del embarazo y durante el mismo
	Nutrición	Malnutrición Obesidad Déficits de micronutrientes	
	Estilo de vida y trabajo	Tabaco Alcohol Drogas de abuso Exceso de actividad física o laboral	Intervenciones comunitarias y conductuales dirigidas hacia las mujeres en edad fértil, basándose en la prevención prenatal mediante diagnóstico precoz y tratamiento de las complicaciones del embarazo
	Salud mental materna	Depresión Maltrato	
	Genética y otros	Riesgo genético (como la historia familiar de incompetencia cervical)	
Parto prematuro provocado	Inducción médica o cesárea, por: Indicación obstétrica Indicación fetal	Existe relación entre los factores de riesgo de PPT espontáneo y la indicación del PPT provocado	Políticas y programas para reducir la práctica de cesáreas que no tengan indicación médica
	Otras causas no médicas		

Fuente: OMS, 2012.

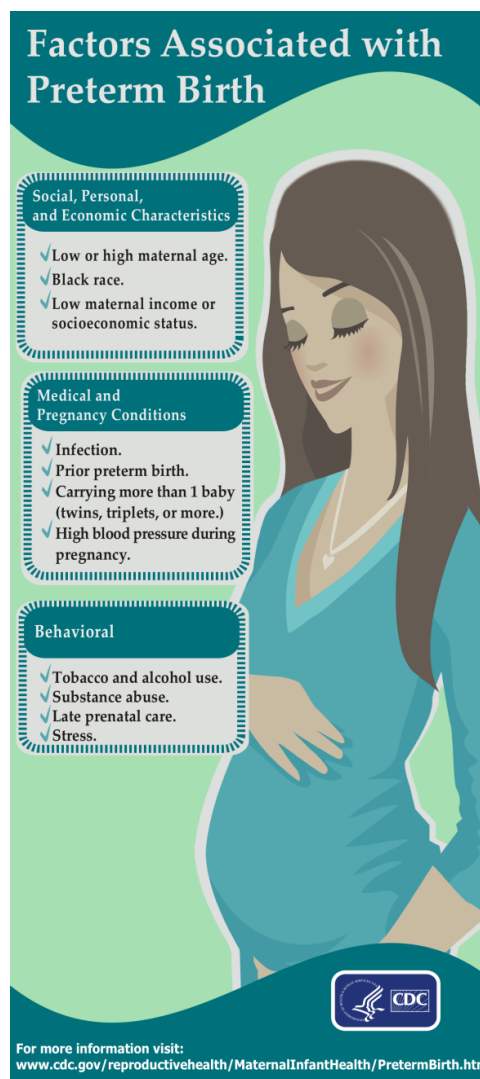


Figura 4. Factores asociados a un parto pretérmino. Información para padres. Fuente: *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2010).

Otros factores maternos asociados con un mayor riesgo de PPT espontáneo son los intervalos cortos entre embarazos, un bajo índice de masa corporal (Goldenberg et al., 2008; Muglia y Katz, 2010) o los embarazos múltiples, que aumentan casi 10 veces el riesgo de PPT en comparación con los embarazos únicos (Blondel et al., 2006). Las tasas de embarazos múltiples naturales varían, dependiendo de las poblaciones, entre un 2,5% en África Occidental y un 0,5% en Japón. Sin embargo, el progresivo aumento de la edad materna durante el embarazo y la creciente disponibilidad de los servicios de reproducción asistida en los países desarrollados ha provocado un gran aumento en el número de nacimientos de gemelos y trillizos (Felberbaum, 2007). Por ejemplo, la tasa de gemelos aumentó más de un 50% en Reino Unido, Francia, Corea del Sur y Estados Unidos entre 1975 y 1998 (Blondel y Kaminski, 2002). La práctica de limitar el número de embriones transferidos durante la fertilización *in vitro* ha comenzado a revertir esta tendencia en algunos países (Kaprio y Marttila, 2005) mientras que, en otros, la tasa de partos gemelares ha seguido aumentando (Lim, 2011; Martin et al., 2010).

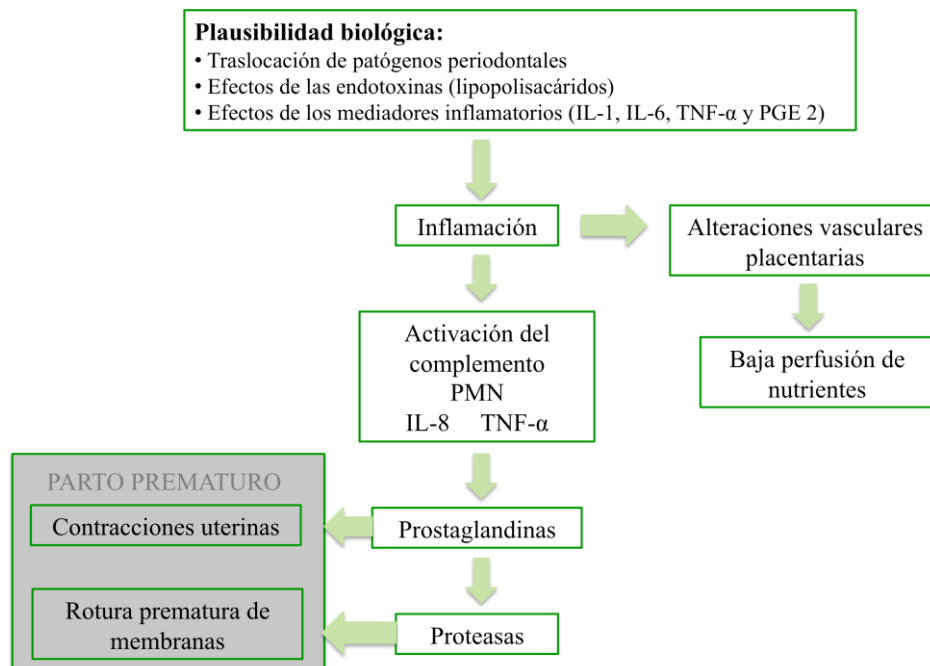


Figura 5. Plausibilidad biológica: Asociación entre la periodontitis materna y el parto prematuro.

IL, interleuquina; PGE 2, prostaglandina E2; PMN, polimorfonucleares; TNF, factor de necrosis tumoral (del inglés, *Tumor Necrosis Factor*).

Las infecciones e infestaciones juegan un papel muy relevante entre los factores que conducen a un PPT. Las infecciones del tracto genitourinario, las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), las infecciones periodontales (Figura 5), la malaria y la sífilis se incluyen entre las que se han asociado a un mayor riesgo de prematuridad (Gravett et al., 2010). Recientemente, se ha observado que otras alteraciones que predisponen al PPT, como la insuficiencia cervical, también son el resultado de una infección intrauterina que provoca inflamación y un acortamiento cervical prematuro (Lee et al., 2008).

Otros factores que predisponen al PPT espontáneo están relacionados con el estilo de vida, incluyendo el estrés (Figura 6), un esfuerzo físico excesivo o pasar largos periodos de tiempo de pie (Muglia y Katz, 2010). El tabaquismo y el consumo excesivo de alcohol también se han asociado con un mayor riesgo de PPT (Gravett et al., 2010).

Por otra parte, el nacimiento prematuro es más frecuente en los niños (~55%) que en las niñas (Zeitlin et al., 2002) (Figura 7) y, además, el riesgo de morir en los varones prematuros es mayor que en las hembras con la misma EG (Kent et al., 2012).

El papel de la raza como factor de riesgo de PPT ha sido ampliamente debatido y existe evidencia de que el periodo gestacional normal puede variar dependiendo del grupo étnico (Ananth et al., 2006). Tradicionalmente se ha considerado que esta variación estaba ligada a factores socioeconómicos o al estilo de vida, pero estudios recientes sugieren que los factores genéticos pueden jugar un papel relevante. Así, los neonatos con ancestros procedentes del África Subsahariana tienden a nacer antes que

los niños caucásicos (Patel et al., 2004; Steer, 2005) pero padecen menos distrés respiratorio (Farrell y Wood, 1976), tienen una menor mortalidad neonatal (Alexander et al., 2003) y es menos probable que requieran una atención especial (Steer, 2005)

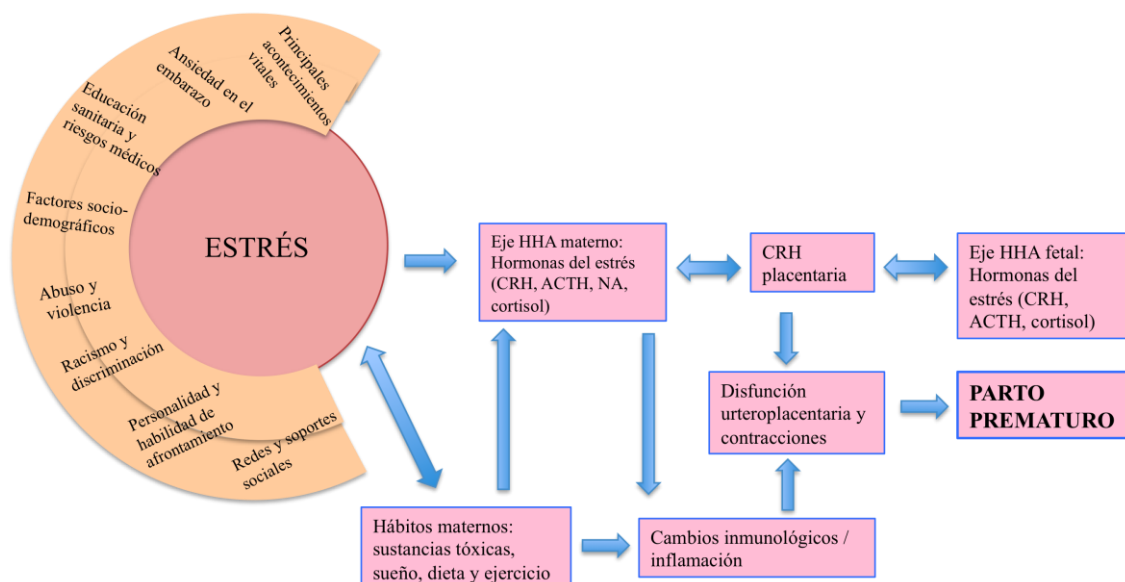


Figura 6. Respuesta fisiológica al estrés en relación al parto pretérmino.

Fuente: Adaptado de Dunkel-Schetter, (1998).

ACTH, hormona adrenocorticotropa (del inglés, *Adrenocorticotropic hormone*); CRH, hormona liberadora de corticotropina (del inglés, *Corticotropin-releasing hormone*); HHA, hipotalámico-hipofisario-adrenal; NA, noradrenalina.

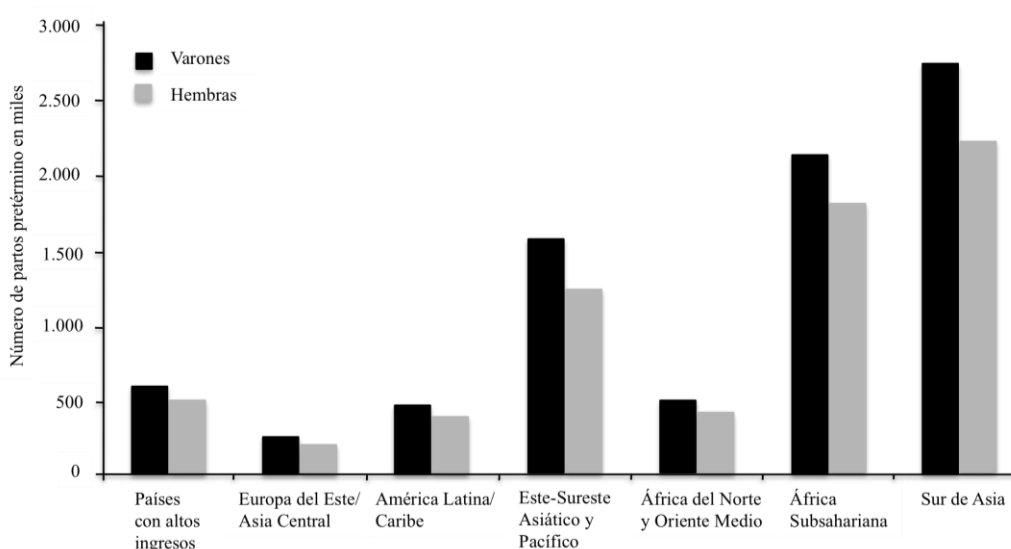


Figura 7. Número de PPT por regiones mundiales en función del sexo en el año 2010. Los varones están representados en negro y las hembras en gris. Fuente: Zeitlin et al., (2002).

Finalmente, los RN con anomalías congénitas son más propensos a nacer prematuramente pero con frecuencia son excluidos de los estudios que recogen las tasas de nacimientos prematuros (OMS, 2012).

II.1.3.2 Partos prematuros inducidos

El número de los nacimientos prematuros inducidos es aún más variable dependiendo del país. Así, la cifra es muy reducida en los países que poseen las mayores tasas de morbilidad y mortalidad neonatal ya que, por una parte, son escasas las mujeres a las que se les hace un seguimiento del embarazo y, por otra, las tasas de cesáreas son bajas (menor del 5% en la mayoría de los países africanos) (Blencowe et al., 2012a). En los países desarrollados suele suceder lo contrario y, en este caso, las cesáreas constituyen la principal causa de nacimiento prematuro inducido.

En 1985, la OMS declaró que no existía justificación médica para que las tasas de cesáreas fuesen mayores del 10 - 15% en cualquier región del planeta (OMS, 1985). Casi tres décadas después, el establecimiento de una tasa óptima de nacimientos por cesárea sigue siendo controvertido, tanto en los países desarrollados como en los que están en vías de desarrollo (Peskin y Reine, 2002). La proliferación de cesáreas en muchos países desarrollados ha conducido a la búsqueda de estrategias para reducir su número ante la evidencia de que las tasas elevadas no sólo no suponen ningún beneficio adicional para la salud sino que, a escala poblacional, pueden aumentar los riesgos para la madre (incluso en futuros embarazos) y tienen un impacto económico mucho más alto para los servicios de salud (*National Collaborating Centre for Women's and Children's Health UK*, 2004; Thomas et al., 2001). En este sentido, más de la mitad de los partos prematuros inducidos en Estados Unidos con una EG de 34 - 36 semanas de gestación se realizaron sin una indicación médica clara (Gyamfi-Bannerman et al., 2011). Además, una cesárea electiva puede resultar en un nacimiento prematuro no deseado debido a errores en la determinación de la EG (Mukhopadhyaya y Arulkumaran, 2007). Paradójicamente, la infrautilización de las cesáreas es uno de los factores que explican la elevada mortalidad perinatal en los países en vías de desarrollo (Weil y Fernández, 1999).

Por otra parte, las causas clínicas que suelen requerir la inducción de un parto prematuro se pueden dividir en maternas y fetales. Entre ellas, las más importantes son la preeclampsia severa, el desprendimiento prematuro de la placenta (*abruptio placentae*), la rotura uterina, la colestasis o colestasia del embarazo, el sufrimiento o distrés fetal y el retraso de crecimiento intrauterino o fetal (Ananth et al., 2006). Ciertas enfermedades o estados subyacentes de la madre (insuficiencia renal, hipertensión arterial (HTA), obesidad, diabetes...) aumentan el riesgo de complicaciones maternas (por ejemplo, la preeclampsia) y están asociadas a una mayor tasa de PPT. En este sentido, es muy probable que la epidemia mundial de obesidad y diabetes se convierta en un factor que contribuya de una forma cada vez más importante a las tasas de PPT. Resulta ilustrativo que, en un estudio realizado en el Reino Unido, el 17% de todos los RN de madres diabéticas fueron prematuros, un valor que duplicaba el de la población general (Steer, 2005). Tanto los factores maternos como los fetales son más frecuentes en los embarazos que se producen tras tratamientos de reproducción asistida, por lo que en esta subpoblación de mujeres

aumenta el riesgo de PPT tanto espontáneo como inducido (Kalra y Molinaro, 2008; Mukhopadhaya y Arulkumaran, 2007)

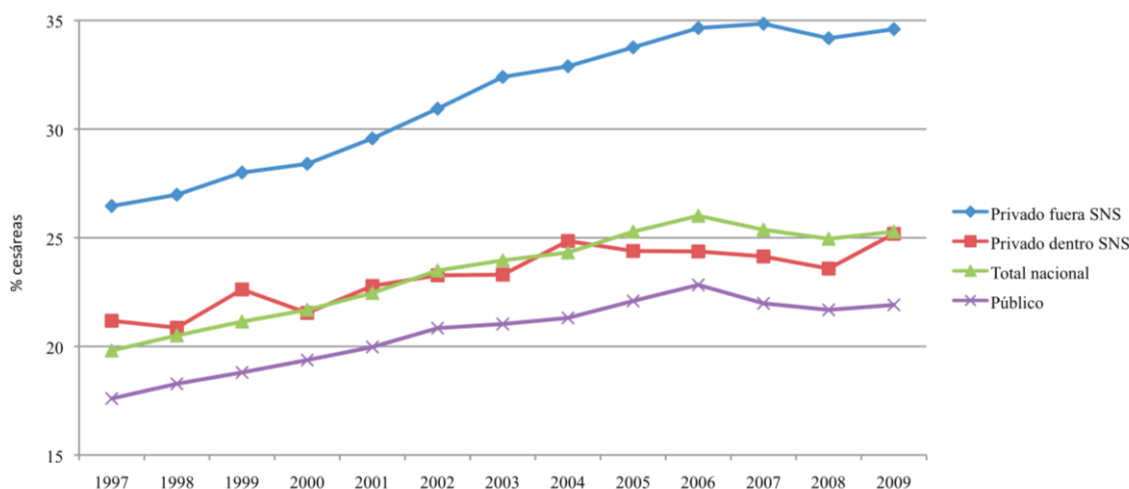


Figura 8. Evolución del porcentaje de cesáreas en España desde 1997 hasta 2009. Fuente: Ministerio de Sanidad, 2012.

SNS: Sistema Nacional de Salud.

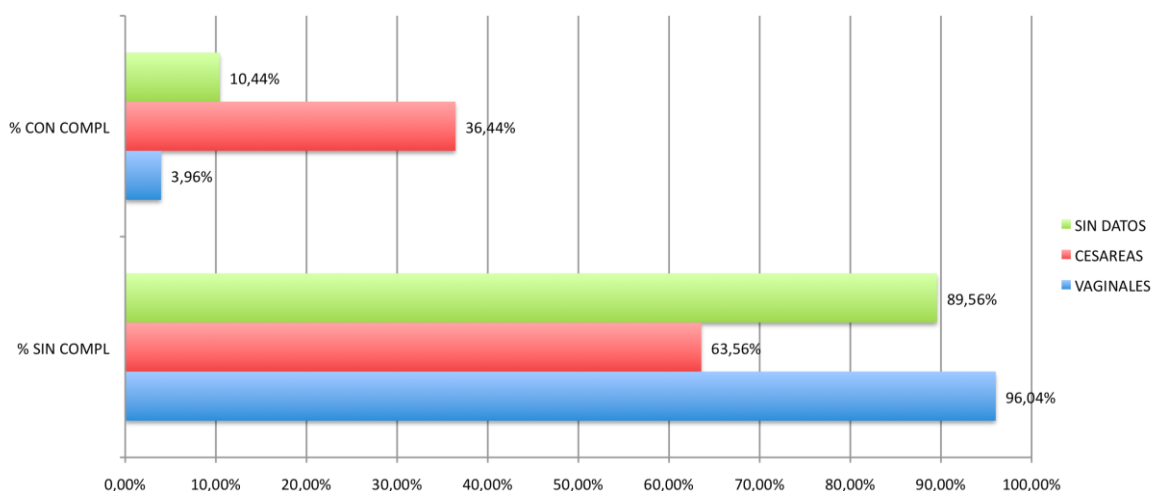


Figura 9. Porcentaje de complicaciones en los partos vaginales y cesáreas realizados en España en el año 2007. Fuente: Instituto Nacional de Estadística (INE).

II.1.4 Prevención del parto pretérmino

II.1.4.1 Prevención del parto pretérmino antes del embarazo

El periodo previo al embarazo puede jugar un papel más importante de lo que muchas mujeres creen en la salud de la futura pareja madre-hijo. El cuidado durante el

periodo de “preconcepción” incluye cualquier intervención que se proporciona a mujeres o parejas en edad reproductiva para identificar y modificar los riesgos biomédicos, conductuales y sociales que, en caso de embarazo, pueden afectar a la salud de la madre y de su hijo (Johnson et al., 2006).

El marco conceptual del cuidado durante este periodo incluye iniciativas que van desde la educación hasta los programas de vacunación o la suplementación con micronutrientes (Figura 10). Estas iniciativas deben promover, simultáneamente, la planificación familiar y las intervenciones para reducir los riesgos (Tabla 3), permitiendo que las mujeres inicien el embarazo en el mejor estado de salud posible y en consecuencia, tener las mayores posibilidades de tener un niño a término y sano.

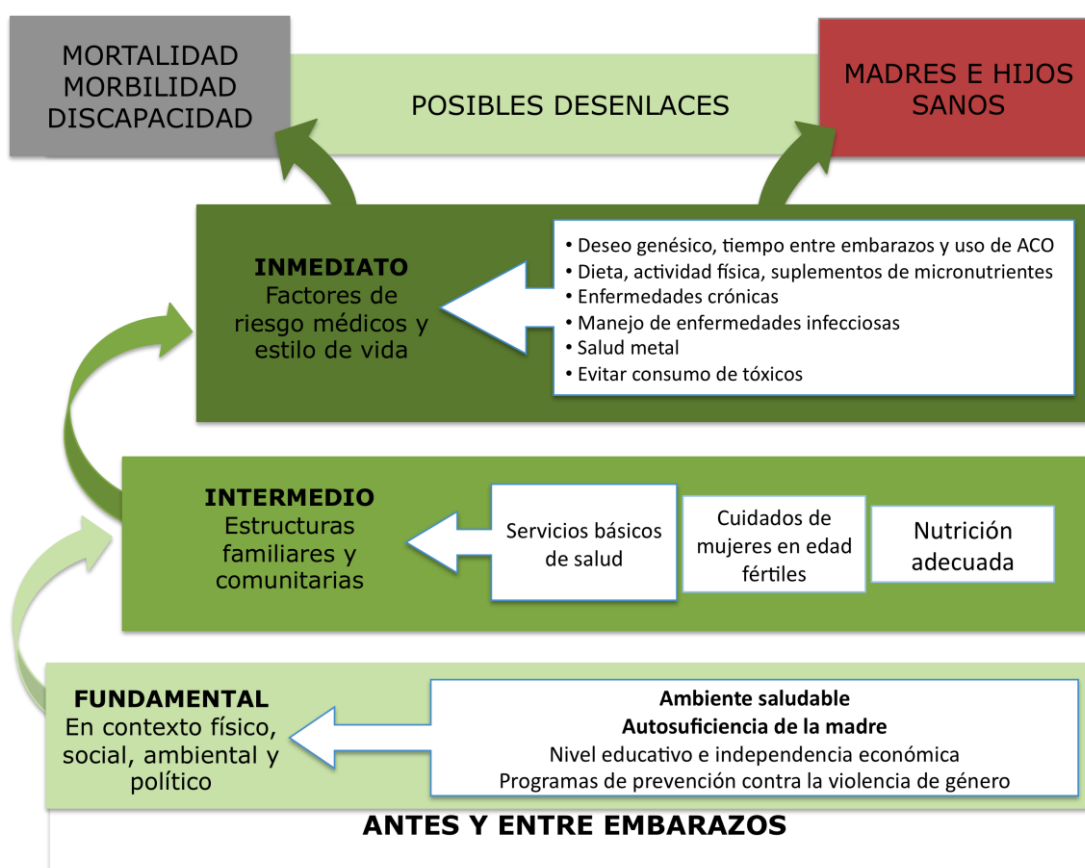


Figura 10. Marco conceptual para la prevención del parto pretérmino antes del embarazo. Fuente: OMS, 2012.

ACO, anticonceptivos orales.

Las medidas preventivas se inician con la prevención del embarazo durante la adolescencia, ya que el porcentaje de PPT es particularmente elevado en ese periodo de la vida. En este sentido, es importante que las mujeres conozcan y apliquen los medios más adecuados para evitar embarazos no deseados y, en consecuencia, puedan planificar su vida reproductiva. La planificación también debe incluir el tiempo

transcurrido entre embarazos sucesivos ya que el riesgo de tener niños prematuros o de bajo peso aumenta cuando dicho periodo es menor de seis meses (Conde-Agudelo et al., 2006; Shah y Zao, 2009). Este hecho puede deberse a que las mujeres no tienen tiempo suficiente para recuperar sus reservas nutricionales o para tratar infecciones (urinarias, vaginales...) u otros problemas (diabetes gestacional, alteraciones tiroideas...) que suelen ser relativamente frecuentes durante el embarazo. Actualmente se considera como ideal un periodo entre gestaciones de 18 - 24 meses (Tsui et al., 2010).

Otro pilar de la prevención del PPT en el periodo previo al embarazo es una nutrición saludable que incluya, cuando se requiera, una fortificación con micronutrientes. Las malformaciones congénitas (defectos del tubo neural, del tracto urinario, de las extremidades, cardiacos...) son motivo de nacimiento pretérmino (Honein et al., 2009). En este sentido, la complementación multivitamínica reduce el riesgo de este tipo de alteraciones en un 42 - 62% y el de preeclampsia en un 27% (Christianson et al., 2006; Dean et al., 2013).

La optimización del peso es otro factor relevante ya que tanto las mujeres con bajo peso antes del embarazo (índice de masa corporal $<18,5 \text{ kg/m}^2$) como aquellas con sobrepeso y obesas (índice de masa corporal $>25 \text{ kg/m}^2$) tienen un riesgo significativamente mayor de tener prematuros y/o RN de bajo peso al nacer (Han et al., 2011; McDonald et al., 2010; Torloni et al., 2009). La obesidad, en particular, es un problema de magnitud creciente a nivel mundial ya que alrededor de 300 millones de mujeres en edad reproductiva son obesas (OMS, 2011). Aunque la evidencia indica que, a cualquier edad, la pérdida de peso supone un reto difícil de conseguir y mantener, se debe promover que estas mujeres modifiquen sus hábitos dietéticos e incluyan una actividad física moderada en su rutina diaria, con la ayuda de programas motivadores hechos a la medida de cada mujer y un sistema de soporte adecuado (Dean et al., 2013; Gavard y Artal, 2008; Rock et al., 2010).

La vacunación de niñas, adolescentes y mujeres en edad fértil frente a infecciones que pueden tener consecuencias devastadoras durante o después del embarazo es otra medida importante para evitar futuros PPT. El virus de la rubéola es un buen ejemplo ya que, por una parte aumenta el riesgo de prematuridad y, por otra, la infección congénita produce efectos teratogénicos, que incluyen desde el aborto espontáneo o la muerte fetal, al síndrome de rubéola congénita en el recién nacido. En consecuencia, la rubéola es un importante problema de Salud Pública y se incluyó en el sistema español de Enfermedades de Declaración Obligatoria (EDO) en 1982. Desde hace años, la mayoría de los países de la Región Europea de la OMS utilizan en sus programas de vacunación bien, la vacuna triple vírica (sarampión, rubéola y parotiditis) o, la vacuna combinada de sarampión y rubéola. Desde la introducción de los programas de vacunación, la incidencia de rubéola ha mostrado una disminución progresiva en nuestro país, pasando de 9,73 casos por 100.000 habitantes en 1997 a 0,02 en 2011 (European Centre for Disease and Control, 2012).

Tabla 3. Factores asociados con un aumento del riesgo de parto pretérmino y la eficacia de las medidas de acuerdo con el grado de evidencia.

¿Cómo de grande es el riesgo?		
Embarazo en la adolescencia	+	Alta prevalencia de anemia, HTA del embarazo, BPN, prematuridad, CIR y mortalidad neonatal
Tiempo entre embarazos, Corto Largo	+	PPT, OR = 1,45; BPN, OR = 1,65 PPT, OR = 1,21; BPN, OR = 1,37
Peso materno antes del embarazo Bajo peso Sobrepeso u obesidad	+	PPT, OR = 1,32; BPN, OR = 1,64 PPT, OR = 1,07 El sobrepeso antes del embarazo es un factor de riesgo para varias complicaciones: HTA, diabetes gestacional, hemorragia posparto, muerte fetal y enfermedades congénitas Ambas situaciones aumentan la probabilidad de necesitar algún tipo de intervención obstétrica en el parto
Déficit de micronutrientes Ácido fólico Hierro	+/-	La deficiencia en ácido fólico está evidentemente relacionada con defectos en el cierre del tubo neural en RN La anemia aumenta el riesgo de mortalidad materna, BPN, PPT, mortalidad infantil
Enfermedades crónicas Diabetes Mellitus HTA Anemia	+	Los RN de mujeres diabéticas tienen mayor riesgo de muerte fetal, mortalidad perinatal y enfermedades congénitas, al igual que de aborto espontáneo, HTA y parto por cesárea Un estudio ha demostrado mayor riesgo de BPN (OR = 6,5)
Salud mental (en especial depresión) y violencia de género	++	Aumento del riesgo de PPT, BPN y depresión durante el embarazo y posparto VG-PPT, OR = 1,37; BPN, OR = 1,17 También, aumento del riesgo de abortos espontáneos, muerte fetal, problemas ginecológicos como ETS y depresión
Enfermedades infecciosas Sífilis VIH Rubeola	++	Aumento del riesgo de abortos espontáneos, muerte fetal e infecciones congénitas
Tabaco	++	Un solo estudio demostró un gran riesgo de PPT, OR = 2,2 Aumento del riesgo de abortos espontáneos, alteraciones placentarias, malformaciones congénitas, síndrome de muerte súbita del lactante, muerte fetal y PPT

Valoración del riesgo:

++, significa evidencia fuerte del riesgo e implica rutas fisiológicas que desencadenan el PPT y BPN (bajo peso al nacimiento)

+, significa evidencia moderada del riesgo de PPT y BPN.

+/-, significa evidencia leve del riesgo de PPT y BPN.

BPN: bajo peso al nacimiento; CIR: crecimiento intrauterino retardado; HTA: hipertensión arterial;

OR = *odds ratio*; PPT: parto prematuro; RN: recién nacido; VG = violencia de género;

Fuente: Adaptado de Barros et al. (2010), Bhutta et al. (2011), Goldenberg et al. (2008), Iams et al. (2008).

En la Comunidad de Madrid (CAM), la incidencia de rubéola ha exhibido una tendencia estable, con tasas de 0,05 casos por 100.000 habitantes en 2010 (3 casos) y 0,06 en 2011 (4 casos) (Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid, 2013). Sin embargo, la circulación del virus en nuestra Comunidad se ha visto favorecida en los últimos años por el gran incremento de población susceptible procedente de otros países. De hecho, en los años 2003 y 2005 aparecieron dos brotes que afectaron especialmente a la población femenina inmigrante. Así, entre el 1 de diciembre de 2002 y el 31 de marzo de 2003 se detectaron 19 casos confirmados, la mayoría mujeres en edad fértil no vacunadas procedentes de países latinoamericanos (Ecuador, Colombia, República Dominicana y Argentina, entre otros) (Comunidad de Madrid, 2004). Dos años después, entre el 1 de enero y el 31 de agosto de 2005 se detectaron 460 casos de rubéola (Comunidad de Madrid, 2005), observándose la incidencia más alta en mujeres de entre 20 y 29 años de edad que procedían en su mayoría de países latinoamericanos. También conviene señalar que en muchos países, tanto de Europa (Italia, Polonia, Rumanía) como de otras regiones del mundo, la vacunación frente a rubéola se ha introducido de forma sistemática en los calendarios de vacunación en la última década; en consecuencia, las poblaciones procedentes de estas zonas pueden ser susceptibles. En este sentido, el número de casos notificados entre noviembre de 2011 y octubre de 2012 por los 29 países que participan en el Sistema de Vigilancia Europeo ascendió a 29.927 casos y el 99,0% de los casos fueron declarados por Polonia y Rumanía (European Centre for Disease and Control, 2012).

Precisamente, entre las cinco estrategias clave del Plan Estratégico 2005-2010 para la eliminación del sarampión y la rubéola y la prevención de la infección por rubéola congénita en la Región Europea de la OMS (OMS, 2005b) destacan las siguientes:

(a) Alcanzar y mantener una cobertura vacunal elevada ($\geq 95\%$) con al menos una dosis de vacuna frente a rubéola, prestando especial atención a grupos de población que posiblemente presenten baja cobertura vacunal (grupos étnicos minoritarios, grupos que rechacen la vacunación por motivos religiosos u otros).

(b) Ofrecer oportunidades de vacunación frente a rubéola a todos los niños, adolescentes y mujeres en edad fértil.

La prevención de enfermedades infecciosas de transmisión sexual (ETS), en particular la sífilis, constituye toda una prioridad para reducir las tasas de mortinatos y de PPT, especialmente teniendo en cuenta su incidencia durante el embarazo de adolescentes. De hecho, las intervenciones centradas en los grupos de alto riesgo, incluyendo las mujeres en edad fértil, los adolescentes y los usuarios de drogas por vía intravenosa, parecen ser particularmente eficaces (Bhutta et al., 2011; Wasserheit y Aral, 1996).

Conviene señalar que en los últimos años se ha producido un aumento en la incidencia de todas las ETS. Tanto es así que, según datos de la OMS, cada año se infectan 448 millones de personas en el mundo de cuatro enfermedades sexuales curables: clamidiasis, sífilis, gonorrea y tricomoniasis. A partir de 1996 se ha producido un importante aumento de sífilis y gonorrea en países de Europa Occidental, y España no es una excepción. Una parte importante del aumento de las ETS es consecuencia del cambio en la percepción del VIH. Desde que, a mediados de los 90, se extendió el tratamiento de triple terapia o cóctel antiviral, cada vez son más las

personas infectadas que no desarrollan SIDA. Con estos tratamientos, pasó a considerarse una enfermedad crónica, y las medidas de protección se relajaron. Además, según la Guía de Buena Práctica Clínica en Infecciones de Transmisión Sexual (Rodríguez Vicente, 2010): *“existen falsos mitos y por ello, los jóvenes siguen sin ponerse el preservativo. Además, contamos con el inconveniente de que los jóvenes no quieren ir al médico por estos problemas”*.

En España, aparecen entre 4 y 10 episodios de gonorrea y aproximadamente 7 - 8 de clamidiasis por cada 100.000 habitantes. Según los últimos datos de la Red Europea de Vigilancia de las Infecciones de Transmisión Sexual, la infección por clamidia es la más frecuente en los países europeos y afecta, sobre todo, a jóvenes y mujeres. Por su parte, el virus del papiloma humano, que puede manifestarse de muchas formas, representa un número creciente de las consultas de ETS. Según los datos de las EDO del Sistema de Información Microbiológica, los casos de sífilis en España, con una tasa del 6,39 por 100.000 habitantes, aumentaron en el año 2010 (un 16% más que en 2009). Generalmente, los pacientes acuden al médico cuando aparece la sintomatología, que suele ser más clara en los hombres que en las mujeres. Pero muchas de estas infecciones son asintomáticas, o tienen síntomas similares, pese a estar causadas por microorganismos diferentes; en consecuencia, la prevención es fundamental para disminuir su incidencia.

Uno de los problemas de este tipo de enfermedades infecciosas es su asociación con el VIH. Como se dice en el ámbito médico, *“una ETS llama a otra ETS”* ya que, por una parte, las úlceras causadas por algunas de estas enfermedades (papiloma, herpes) suponen una vía de entrada para el VIH. Y, por otra parte, quien no se ha protegido frente a una ETS no lo ha hecho frente a las otras. Según el informe de ONUSIDA, en 2008 se produjeron más de 7.400 nuevas infecciones diarias por VIH, de las cuales 1.200 ocurrieron en menores de 15 años. Del resto, el 48% eran mujeres y el 40% jóvenes de entre 15 y 24 años. En España, el Registro Nacional de Casos de SIDA recogía un total de 1.170 nuevos casos de SIDA durante 2008, con un descenso del 15% del número de casos diagnosticados respecto al año anterior. Esta tendencia a la baja de los casos de SIDA contrasta con el aumento de otras ETS. En cuanto a la incidencia de VIH, se notificaron 3.210 nuevos diagnósticos en 2012, lo que supone una tasa de 8,5 por cada 100.000 habitantes.

Las tasas de incidencia de ETS en la Comunidad de Madrid son ascendentes desde el año 2000 (Figura 11). Los casos de gonorrea y sífilis, las dos ETS de declaración obligatoria, se duplicaron en la región en solo un año. Así, en 2010 se notificaron 648 casos de sífilis, mientras que en 2009 fueron 339. El incremento es, por tanto, de un 91,2%, según recoge el informe "Morbilidad por enfermedades de declaración obligatoria en la Comunidad de Madrid", realizado por el Servicio de Epidemiología de la Consejería de Sanidad. Los casos de infección gonocócica (gonorrea) notificados en 2010 fueron 337, cuando el año anterior el recuento fue de 168, lo que representa una subida del 100,6%. La tasa de incidencia de la infección gonocócica y de sífilis en 2010 en la Comunidad de Madrid fue de 5,2 y 10 casos por 100.000 habitantes, respectivamente, según el informe del Servicio de Epidemiología.

El incremento de las relaciones sexuales sin protección aumenta la incidencia de las ETS entre los jóvenes y conduce a embarazos no deseados en adolescentes; a su vez, ambos factores favorecen la presencia de un PPT. De hecho, la población en la que, bien por ignorancia o bien por despreocupación, está afectando más el aumento de

las ETS es la de los jóvenes. Los datos de diagnósticos de VIH son elocuentes: en 2004, un 1,8% de los casos tenía entre 13 y 20 años. La proporción ya era del 10% en 2010 (Plan Nacional sobre el SIDA). Además, en muchos casos se trata de personas que, aunque tienen la información necesaria, no la ponen en práctica cuando tienen relaciones, sobre todo si están bajo los efectos del consumo de drogas, incluyendo el alcohol.

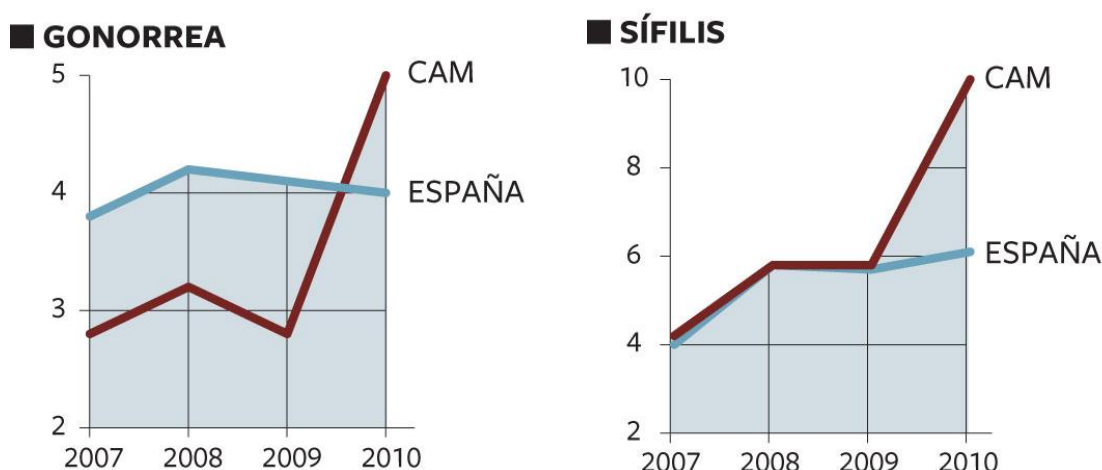


Figura 11. Tasas de gonorrea y sífilis (casos por cada 100.000 habitantes) en la Comunidad de Madrid (CAM) y en España entre los años 2007 y 2010.

El consumo de tabaco o la exposición pasiva al humo generado por fumadores aumenta notablemente el riesgo de retraso en el crecimiento fetal y de parto prematuro (Bloch et al., 2008; Cnattingius, 2004; Honein et al., 2007). Algunos estudios han demostrado que un correcto asesoramiento previo a la concepción junto con la implicación de las parejas pueden aumentar el número de mujeres que dejan de fumar o evitan la exposición al humo antes del embarazo (Elsinga et al., 2008; Park et al., 2004).

Diversos factores de estrés físico y psicológico, como la depresión, la ansiedad, los problemas socioeconómicos o la violencia de género, determinan un mayor riesgo de PPT (Austin y Leader, 2000; Coker et al., 2004; Hegarty et al., 2004; Sharps et al., 2007; Yonkers et al., 2009), posiblemente mediado por rutas inflamatorias relacionadas con el cortisol (Challis y Smith, 2001; Wadhwa et al., 2001). Cuando dichos factores están presentes antes del embarazo es muy probable que persistan durante el mismo. Por otra parte, las mujeres con factores de estrés psicosocial tienen una mayor probabilidad de sufrir otros comportamientos de riesgo para el PPT, como el tabaquismo o el consumo de alcohol, y son menos propensas a buscar atención sanitaria (Schoenborn y Horm, 1993; Zuckerman et al., 1989). Las intervenciones para mejorar la salud psicológica de las mujeres antes de la concepción han incluido desde las terapias de grupo hasta el desarrollo de programas de capacitación laboral.

II.1.4.2 Prevención del parto pretérmino durante el embarazo

El embarazo representa un periodo crítico para realizar intervenciones que ayuden a reducir el riesgo de PPT, la mortalidad materno-infantil y otros efectos adversos asociados a un nacimiento antes de tiempo. En este sentido, el riesgo de un PPT es menor en las mujeres que reciben una atención prenatal adecuada (Iams et al., 2008). En general, las intervenciones disponibles están destinadas a tres grupos de población: (1) todas las mujeres embarazadas; (2) las mujeres embarazadas con antecedentes de PPT u otros factores de riesgo, incluyendo gestación múltiple, sangrado durante el embarazo y otros trastornos, como HTA o diabetes; y (3) las mujeres que han iniciado un PPT.

La atención prenatal representa una plataforma de servicios para el seguimiento de las mujeres a lo largo del embarazo con el objetivo de que la salud materna y del neonato sea la mejor posible. Entre los servicios básicos que tienen un impacto potencial en la reducción de las tasas de PPT destacan la identificación de mujeres con embarazo de riesgo, el cribado y el tratamiento de diversas infecciones (VIH, tuberculosis, vaginosis bacteriana, bacteriuria...), el asesoramiento nutricional (incluyendo la identificación y corrección de la malnutrición), una correcta preparación para el parto o las intervenciones de apoyo conductual y social, tales como los programas para dejar de fumar o los destinados a la prevención de la violencia contra las mujeres (Holbrook y Kaltenbach, 2011; OMS, 2003; OMS, 2005a; OMS, 2005c; OMS. Reproductive Health, 2003). El papel de las infecciones se analizará en un apartado posterior (II.2.5).

Por lo que respecta al estado nutricional de la mujer durante el embarazo, la desnutrición aumenta la vulnerabilidad a la infección y predispone a las embarazadas a sufrir problemas obstétricos, incluyendo un mayor riesgo de PPT (Goldenberg et al., 2008). Los estudios enfocados a la búsqueda de posibles relaciones entre la obesidad y el PPT han proporcionado resultados variables (Requejo et al., 2013). Las investigaciones más recientes sugieren que la asociación entre el índice de masa corporal y el riesgo de PPT puede ser diferente según la raza o grupo étnico, lo que subraya la complejidad del papel que la nutrición puede desempeñar en el desencadenamiento del PPT (Torloni et al., 2012).

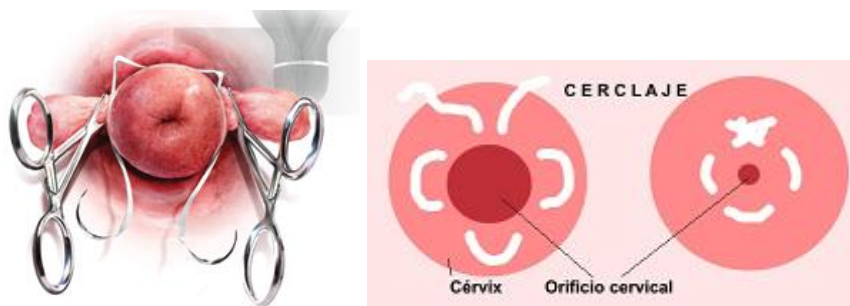
Los ensayos clínicos realizados hasta el momento no muestran una relación clara entre la administración de diversos complementos dietéticos (zinc, calcio, magnesio, aceite de pescado, preparados proteínicos o calóricos...) durante el embarazo y la disminución del índice de nacimientos prematuros (Requejo et al., 2013). En este sentido, son necesarios más estudios para determinar el momento óptimo durante la vida de una mujer en el que las intervenciones nutricionales pueden contribuir a reducir el riesgo de PPT. En cualquier caso, se debe fomentar que las mujeres embarazadas tomen complementos multivitamínicos por otras razones de salud, como la reducción del riesgo de bajo peso al nacer o de defectos del tubo neural.

Entre las mujeres embarazadas, se pueden identificar aquéllas con un mayor riesgo de PPT sobre la base de su historia obstétrica (por ejemplo, anomalías uterinas o cervicales conocidas o un PPT previo), su estado a lo largo del embarazo (síndrome hipertensivo, diabetes, embarazo múltiple, sangrado...) o su edad (adolescentes) (Moore, 2002; Tsikouras et al., 2012). Hay varios enfoques para la prestación de

atención preventiva para estas mujeres, aunque sería deseable disponer de más herramientas de detección de riesgos basadas en el uso de biomarcadores demográficos y epidemiológicos y de indicadores clínicos (Requejo et al., 2013).

Existe un grupo de muy alto riesgo de PPT espontáneo que incluye a las gestantes asintomáticas con gestación única con antecedente de PPT y cérvix corto en la gestación actual. Para este grupo concreto se han publicado recientemente tres intervenciones eficaces: el empleo de progesterona (Berghella y Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee, 2012; Romero et al., 2012), la realización de un cerclaje cervical (Alfirevic et al., 2012) o la colocación de un pesario cervical (Goya et al., 2012) (Figura 12). El análisis de los tres protocolos de manejo no parece revelar diferencias en la reducción de la tasa de PPT ni en la morbilidad perinatal (Alfirevic et al., 2012); no obstante, se necesitan nuevos estudios prospectivos aleatorizados en los que se comparen directamente las tres estrategias en este grupo de mujeres para poder establecer la mejor herramienta.

A



B

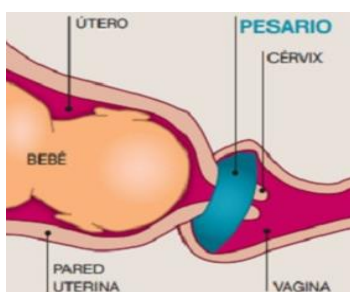


Figura 12. Esquema de la aplicación de un cerclaje (A) y un pesario (B), como métodos para prevenir el parto pretérmino en mujeres de riesgo.

Una vez que el parto prematuro ha comenzado, hay intervenciones que pueden prolongar el embarazo y contribuir a un mejor estado de salud del RN prematuro. Entre ellas, se incluyen, la provisión de agentes tocolíticos (antagonistas de la oxitocina, betamiméticos, bloqueadores de los canales de calcio, sulfato de magnesio) que inhiben las contracciones uterinas y retrasan el parto. La administración de tocolíticos es eficaz para enlentecer el parto, permitiendo el tratamiento con corticosteroides y, en su caso, el traslado de la madre a un centro más adecuado. Cualquier estrategia para prolongar un parto o una cesárea debe contemplar los posibles efectos adversos derivados de una exposición prolongada a condiciones subóptimas, tanto para la madre como para el feto.

La administración de corticosteroides prenatales para embarazadas con alto riesgo de parto prematuro (a partir de las 23 semanas de gestación) puede reducir significativamente el riesgo de muerte, el distrés respiratorio y los problemas de desarrollo del RN prematuro. Por otro lado, la ruptura prematura de las membranas está frecuentemente asociada con la infección de las membranas amnióticas, hecho que contribuye al PPT y que puede conducir a problemas neonatales serios, como la parálisis cerebral o la enfermedad pulmonar crónica. En tal circunstancia, el tratamiento con antibióticos puede retrasar el inicio del parto durante un máximo de 48 horas y reducir el riesgo de secuelas en el neonato. Finalmente, la administración de sulfato de magnesio a las mujeres en situación de riesgo de PPT ayuda a proteger el cerebro del niño, reduce las tasas de parálisis cerebral y mejora el estado de salud del niño a largo plazo. No obstante, se necesitan más estudios para evaluar los efectos secundarios que estos tratamientos pueden tener para la madre (enrojecimiento, sudoración, náuseas, vómitos, dolores de cabeza, taquicardia...) y determinar los procedimientos más adecuados para evitarlos o minimizarlos.

Hay diversas intervenciones políticas que también pueden contribuir notablemente a la reducción del riesgo de PPT durante el embarazo. Por ejemplo, las políticas de tratamiento de la infertilidad, incluyendo el uso de los procedimientos de reproducción asistida que limitan el número de embriones que se pueden transferir, han demostrado ser eficaces reduciendo el número de embarazos gemelares o múltiples (y, en consecuencia con un alto riesgo de PPT) en Europa, Australia y Estados Unidos (Iams et al., 2008; Jain et al., 2004; Min et al., 2006). Las políticas hospitalarias destinadas a la reducción de las tasas de cesáreas e inducciones tempranas, en particular cuando no están indicadas desde un punto de vista médico, también contribuyen a prolongar el embarazo y a tratar de revertir la tendencia creciente de los nacimientos por PPT. Tales políticas son especialmente necesarias en aquellos lugares donde las tasas de cesárea (y especialmente, cesárea electiva) son elevadas (países desarrollados) o están en franco aumento (América Latina) (Iams et al., 2008).

Las políticas laborales encaminadas a promover un embarazo saludable y proteger a las mujeres embarazadas en su lugar de trabajo constituyen otra herramienta importante para reducir el riesgo de PPT. Entre las acciones que se pueden realizar en este sentido se encuentran la disponibilidad de tiempo para acudir a las revisiones médicas y atender los cursos de preparación al parto, la exención de los turnos de noche y de las tareas que requieran levantar objetos pesados, permanecer de pie durante largos períodos de tiempo o la exposición a factores físicos, químicos, biológicos, ergonómicos o psicológicos que representen un riesgo para el embarazo (Agbla et al., 2006; Saurel-Cubizolles et al., 2004).

II.1.5 Problemas a corto y largo plazo asociados a la prematuridad

Existen tres mundos muy diferentes en los que un niño prematuro puede nacer y ese hecho resulta determinante en el tipo y consecuencias de los problemas que puede sufrir a corto y medio plazo (Blencowe et al., 2013):

(a) Países pobres con bajos recursos. Están asociados a una elevada tasa de mortalidad entre los niños prematuros, incluso entre los prematuros tardíos. De los,

aproximadamente, dos millones de muertes anuales de prematuros, el 75% se producen en el Sudeste Asiático y en el África Subsahariana, donde la tasa de mortalidad neonatal de prematuros es seis veces mayor que en los países desarrollados. En estos escenarios, la reducción de la mortalidad sigue siendo el objetivo prioritario.

(b) Países con un nivel medio de ingresos, incluyendo países emergentes: Son países en los que se ha producido una reducción rápida de la tasa de mortalidad neonatal y en los que ha aumentado la disponibilidad de cuidados intensivos neonatales aunque la calidad de la atención es variable. Se caracterizan por un elevado índice de discapacidad entre los prematuros que sobreviven (por ejemplo, se estima que casi la mitad de los niños muy prematuros sobrevivientes en Asia Central y América Latina tienen alguna discapacidad a largo plazo). La mayoría de esas discapacidades se podrían prevenir con una mejora de la calidad de la atención posnatal.

(c) Países desarrollados o de altos ingresos. Tienen una tasa de mortalidad neonatal muy baja y poseen políticas sólidas de cuidados pre- y posnatales que evitan o reducen las complicaciones y secuelas. Para estos países, el foco de atención en los últimos años han sido los prematuros extremos (<26 semanas), ya que son los que conllevan una mayor morbilidad y mortalidad y plantean cuestiones morales y éticas complejas.

En cualquier caso, la inmadurez anatómica y/o funcional de los RN prematuros hace que el riesgo de que padezcan complicaciones o que tengan secuelas a corto, medio y largo plazo sea mucho mayor que el de los nacidos a término (Eichenwald y Stark, 2008) (Figura 13). Este riesgo aumenta a medida que disminuye la EG y el PN. Por lo tanto, los niños que son muy prematuros, (≤ 25 semanas de gestación) o que tienen un peso muy bajo o extremadamente bajo al nacer son los que presentan las tasas más altas de mortalidad y, si sobreviven, son los que tienen mayor riesgo de problemas *a posteriori*. Así, en un estudio del Instituto Nacional de Salud Infantil de Estados Unidos se observó que las complicaciones a corto plazo más frecuentes, entre 8.515 niños con peso extremadamente bajo al nacer, fueron el distrés respiratorio (93%), la retinopatía del prematuro (59%), la presencia de ducto arterioso permanente (46%), la displasia broncopulmonar (42%), las sepsis tardías (36%), la enterocolitis necrotizante (11%) y las hemorragias intraventriculares de grado III y IV (7 y 9%, respectivamente) (Stoll et al., 2010).

A pesar de que el riesgo de complicaciones disminuye con la EG, la morbilidad de los prematuros tardíos sigue siendo significativamente más elevada que la de los nacidos a término. En este sentido, en un estudio reciente que incluía 6.674 niños prematuros suecos con una EG entre 30 y 34 semanas se observó una elevada frecuencia de diversas complicaciones, como hiperbilirrubinemia (59%), enfermedad respiratoria aguda (28%), hipoglucemia (16%) e infecciones bacterianas (15%) (Altman et al., 2011).

La adecuada estabilización inicial de un RN prematuro en la sala de partos es un factor clave para reducir el riesgo de complicaciones (Niermeyer et al., 2000). Los prematuros corren mayor riesgo de sufrir hipotermia al nacer, debido a su gran superficie relativa y a su incapacidad para generar suficiente calor. La hipotermia puede contribuir a trastornos metabólicos tales como la hipoglucemia o acidosis. En prematuros de menos de 26 semanas de EG, la hipotermia se asocia con una mayor

mortalidad y, en los supervivientes, con cuadros de insuficiencia pulmonar (Costeloe et al., 2000). Por tales motivos, los RN prematuros requieren intervenciones adicionales al protocolo estándar de prevención de hipotermias neonatales en la sala de partos. Estas intervenciones se basan en crear barreras para evitar la pérdida de calor (mantas, bolsas de polietileno/poliuretano...) o en recurrir a fuentes de calor externas (contacto piel con piel, colchón transmisor de calor...) (Ibrahim y Yoxall, 2010; McCall et al., 2010; Trevisanuto et al., 2010). Una vez en la UCIN, los RN prematuros deben ser atendidos en una incubadora, cuna térmica o mediante el método madre canguro (que se tratará posteriormente) para evitar la hipotermia.

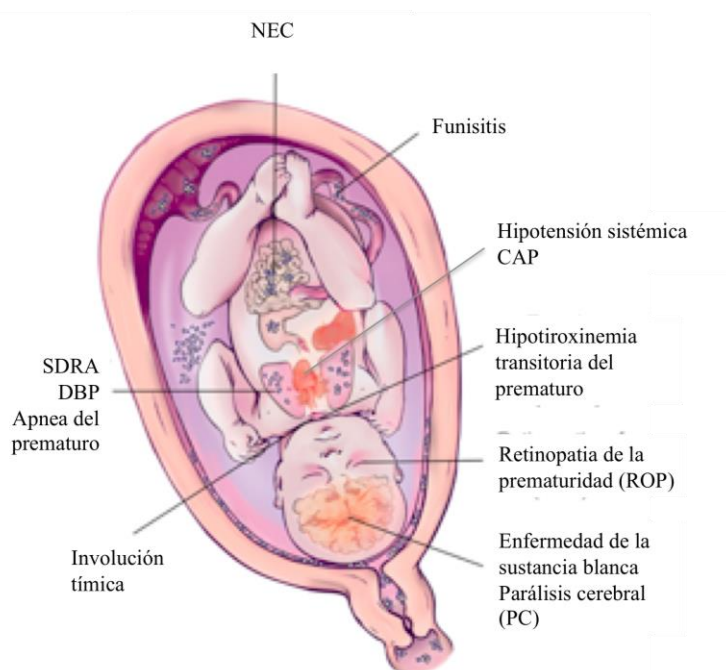


Figura 13. Principales problemas de salud asociados a la prematuridad.

Fuente: Adaptado de Gantert et al., (2010).

CAP, Conducto arterioso persistente; DBP, displasia broncopulmonar; SDRA, Síndrome de distrés respiratorio agudo.

Inmediatamente después de su nacimiento, los RN prematuros deben disponer de una monitorización continua de la respiración y la frecuencia cardíaca. También se debe medir el nivel de oxígeno en sangre para evitar las consecuencias de la hipoxia o hiperoxia. Las complicaciones respiratorias más frecuentes asociadas a la prematuridad son (a) el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), causado por deficiencia de surfactante; (b) la displasia broncopulmonar (DBP) o enfermedad pulmonar crónica, una enfermedad respiratoria que se presenta comúnmente como una complicación tardía en los neonatos con muy bajo peso al nacer y que se define como la dependencia de oxígeno a las 36 semanas de EG; y (c) la apnea del prematuro. Por lo que respecta a las complicaciones cardiovasculares, destacan el conducto arterioso persistente (Fanaroff et al., 2007) (Figura 14), la hipotensión sistémica (Barrington, 2011; Batton et al., 2012; Vain y Barrington, 2012) y la hemorragia intraventricular (Fanaroff et al., 2007; Stoll et al., 2010).

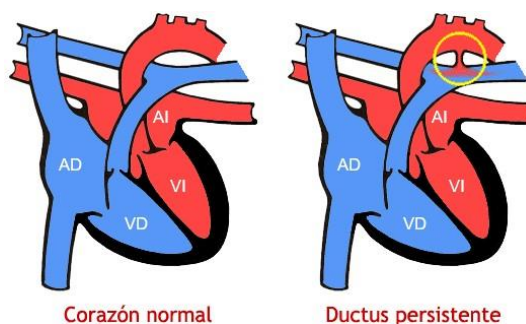


Figura 14. Circulación normal y ductus arterioso persistente.

Los trastornos en el aporte o en el metabolismo de la glucosa pueden provocar hipoglucemia o hiperglucemia. Por ese motivo, se debe monitorizar la glucemia rutinariamente hasta que la alimentación esté bien establecida y se obtengan valores fisiológicos.

La retinopatía del prematuro se debe a una vascularización incompleta de la retina, tiene una evolución irregular hasta las semanas 40 - 45 de EG y se resuelve espontáneamente en la mayoría de los casos. Sin embargo, los prematuros con retinopatía grave tienen un mayor riesgo de discapacidad visual en el futuro. La enterocolitis necrotizante (NEC; del inglés, *Necrotizing Enterocolitis*) y las sepsis tempranas o tardías son otras complicaciones a corto plazo que se asocian frecuentemente a la prematuridad y que se tratarán posteriormente.

A pesar de todas las complicaciones que se manifiestan a corto plazo, la mayoría de los RN prematuros nacidos en nuestro entorno sobreviven sin daño alguno. Sin embargo, se estima que más de la mitad de los prematuros nacidos con una EG menor de 28 semanas y aproximadamente el 5% de los nacidos entre las 32 y las 36 semanas sufren a largo plazo algún problema de salud relacionado con la prematuridad (Escobar et al., 2006; Shapiro-Mendoza et al., 2008). Nuevamente, los promedios mundiales revelan importantes diferencias regionales; en este sentido, resulta esclarecedor que el 52% de todos los nacidos vivos, el 60% de los nacimientos prematuros y el 75% de las muertes de neonatos prematuros se produzcan en el África Subsahariana y Asia Meridional. Esta elevada tasa de mortalidad entre prematuros hace que la cifra de aquellos que sobreviven y tienen alguna discapacidad sea, en comparación con las anteriores, relativamente baja (46%) (Blencowe et al., 2013). Por otra parte, un RN nacido vivo antes de las 32 semanas de gestación tiene una probabilidad del 53% de sobrevivir al periodo neonatal sin deterioro neurológico posterior en países desarrollados, mientras que la cifra baja al 27% si nació en el sur de Asia o en el África Subsahariana.

En cualquier caso, globalmente existe una tasa relativamente elevada de hospitalizaciones recurrentes, deterioro neurológico a largo plazo y diversas enfermedades crónicas entre los niños que nacieron prematuramente y sobrevivieron a los primeros meses de vida. En primer lugar, las hospitalizaciones recurrentes aumentan a medida que disminuye la EG y entre las causas más frecuentes de reingreso destacan los trastornos respiratorios, incluyendo infecciones respiratorias y asma, y los problemas gastrointestinales, como el reflujo gastroesofágico o las gastroenteritis (Boyle et al., 2012).

Numerosos estudios han descrito una asociación entre el PPT y un amplio abanico de secuelas neurológicas a largo plazo, incluyendo dificultades en el aprendizaje, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, autismo, ansiedad y trastornos emocionales, especialmente en los nacidos muy prematuros (Aarnoudse-Moens et al., 2009; Elgen et al., 2012; Johnson et al., 2010; Johnson y Marlow, 2011; Nosarti et al., 2012; Pinto-Martin et al., 2011), pero también en prematuros tardíos (de Jong et al., 2012; Quigley et al., 2012; Talge et al., 2010). El nacimiento prematuro, a cualquier EG, está igualmente asociado con problemas respiratorios, cardiovasculares, renales, reproductivos y metabólicos a largo plazo (Bacchetta et al., 2009; Bolton et al., 2012; Carmody y Charlton, 2013; Fawke et al., 2010; Hack et al., 2011; Keijzer-Veen et al., 2010; Kerkhof et al., 2012; Kotecha et al., 2012; Parkinson et al., 2013; Rotteveel et al., 2008; Swamy et al., 2008). Los niños muy prematuros también son más propensos a mostrar un crecimiento retrasado o más lento con respecto a los nacidos a término (Bocca-Tjeertes et al., 2011; Boyle et al., 2012; Bracewell et al., 2008).

Tabla 4. Frecuencia de los principales problemas de salud de los recién nacidos prematuros.

Enfermedad o trastorno	Frecuencia	Lugar habitual de aparición y tiempo hasta su resolución
- Taquipnea transitoria del RN	Afecta a muchos RN prematuros	Comienza y se resuelve antes del alta de la unidad neonatal pero puede necesitar tratamiento posterior
- Ictericia		
- Tensión baja		
- Baja glucemia		
- Apnea y bradicardia		
- Síndrome distrés respiratorio		
- Retinopatía de la prematuridad	Afecta a los prematuros de menor tamaño	Comienza en la unidad neonatal pero a menudo precisa tratamiento después del alta
- Conducto arterioso persistente		
- Enterocolitis necrotizante (NEC)		
- Enfermedad pulmonar crónica o displasia broncopulmonar (DBP)		
- Sepsis		
- Infección por el virus respiratorio sincitial (VRS)	Afecta a muchos recién nacidos prematuros	A veces comienza en la unidad neonatal, aunque habitualmente aparece después del alta hospitalaria

II.1.6 Manejo de los niños prematuros: alimentación

En nuestro entorno, el manejo de los niños prematuros ha mejorado notablemente en las últimas décadas gracias a los avances científicos y tecnológicos, un hecho que se ha traducido en una disminución espectacular en las tasas de mortalidad y morbilidad, incluso en niños con edades gestacionales muy bajas (<26 semanas). El cuidado de un RN se debe iniciar en la misma sala de partos (equipada para cualquier eventualidad) por parte de personal competente, evitando las separaciones innecesarias entre la madre y el niño y proporcionando al prematuro un ambiente cálido y limpio, la posibilidad de disfrutar precozmente de una lactancia materna exclusiva siempre que sea posible y procedimientos de reanimación cuando se requieran (Beck et al., 2010). Todas estas prácticas son importantes para cualquier neonato pero, en el caso de los prematuros, la ausencia o retraso de alguna de ellas puede conducir a un deterioro rápido de la salud (Tabla 5) (OMS, 2012). Posteriormente, existen diversos protocolos en función de la EG, peso al nacer y complicaciones que pueda sufrir un prematuro. No obstante, este capítulo se va a centrar en un aspecto concreto del manejo de esta población: la alimentación.

Tabla 5. Manejo del niño prematuro: intervenciones prioritarias.

Cuidados esenciales para todos los RN	Grado de evidencia y recomendación
Atención térmica (secado, calentamiento, piel con piel y retraso del baño)	Evidencia: baja o moderada
Cadena de higiene y cuidado de la piel	Recomendación: muy alta
Iniciación precoz, lactancia materna exclusiva	
Reanimación neonatal para RN sin respirar	Evidencia: baja o moderada Recomendación: muy alta
Cuidados extra para RN pequeños	
Cuidado madre-canguro para RN con BPN (<2.000g)	Evidencia: moderada o alta
Apoyo para la alimentación	Recomendación: muy alta
Cuidados para RN prematuro con complicaciones	
Trato especial de RN con signos de infección	
Administración segura de oxígeno y cuidados de apoyo para el SDRA	Evidencia: moderada o alta
Trato especial de RN con ictericia significativa	Recomendación: muy alta
Hospitalización de RN prematuro con SDRA incluyendo, si fuera necesario, a los RN con CPAP y/o que hayan recibido surfactante	Evidencia: moderada o alta Recomendación: muy alta
Cuidados neonatales intensivos	Evidencia: alta Recomendación: muy alta

BPN, bajo peso al nacimiento; CPAP, presión positiva continua en la vía aérea (del inglés, *Continuous positive airway pressure*); RN, recién nacido; SDRA, síndrome de distrés respiratorio agudo

La población de neonatos prematuros es muy heterogénea y, en consecuencia, las necesidades nutricionales pueden variar notablemente. Las recomendaciones que se dan a continuación van dirigidas a la nutrición de los RN de muy bajo peso (<1500 g)

y los de extremadamente bajo peso (<1000 g), que habitualmente tienen menos de 32 semanas de EG. Estos prematuros son los que presentan más problemas durante su estancia hospitalaria y desarrollan más complicaciones a largo plazo por los aportes nutricionales deficitarios durante los primeros momentos.

Cuando un RN nace prematuramente, el aporte de nutrientes que sustenta su crecimiento durante su vida intrauterina se ve bruscamente interrumpido. Hoy se acepta que este aporte se debe restaurar lo antes posible para conseguir un crecimiento lo más próximo al crecimiento fetal durante el período hospitalario y optimizar su crecimiento y niveles de neurodesarrollo a largo plazo (Ziegler, 2011). Aunque existen métodos para estimar el gasto calórico y las necesidades energéticas del RN y de esta forma poder estimar sus necesidades nutricionales, en la práctica clínica los parámetros nutricionales de peso, longitud y perímetro cefálico continúan siendo los de elección en la programación de su nutrición durante la estancia hospitalaria (Hall, 2001).

Diversas intervenciones nutricionales tempranas (nutrición parenteral precoz, nutrición enteral trófica, fortificación) tienen el objetivo de evitar la subnutrición y disminuir el número de pacientes con peso, longitud y perímetro cefálico por debajo de los valores esperados para su edad corregida. Estas medidas, con una amplia variabilidad interpersonal e intercentros (Klingenberg et al., 2012), deben contar con un soporte nutricional adecuado durante todo el periodo de crecimiento compensatorio, dado que el primer año de vida es clave para la recuperación nutricional y que los requerimientos son mayores en los RN con déficits nutricionales previos.

Después de nacer, los niños prematuros pueden ganar 15 - 20 g/kg/día, valores similares a los del feto *in utero*. Este aumento de peso es difícil de conseguir durante las primeras semanas de vida y, por lo general, no se consigue hasta 1 o 2 semanas después del nacimiento (Embleton et al., 2001; Fanaro, 2010). Esto contribuye a que, aunque la mayoría de los prematuros al nacer tienen un peso acorde con su EG, al abandonar el hospital suelen tener un peso inferior al percentil 10 para su edad. Esta subnutrición puede ser consecuencia tanto de un aporte nutricional insuficiente como de complicaciones que incrementen los requerimientos nutricionales y que a la larga pueden ocasionar problemas neurológicos y metabólicos (Ehrenkranz, 2010; Sakurai et al., 2008). En este sentido, un RN con menos de 1 kg contiene tan sólo un 1% de grasas y un 8% de proteínas con una reserva calórica no proteica de 110 kcal/kg, lo que es escasamente suficiente para mantener las necesidades basales durante los primeros 4 días de vida. Si a esto se añade una insuficiencia respiratoria o una sepsis el consumo metabólico es mucho mayor y estas reservas se agotan mucho antes (Monasterolo et al., 2013). Por ello, el manejo nutricional del RN prematuro afecta a su morbilidad a corto, medio y largo plazo (Gianni et al., 2012; Klingenberg et al., 2012).

Para minimizar la falta de nutrientes que ocurre tras el parto y reducir la interrupción del crecimiento y desarrollo que ocurre tras el parto prematuro, se han propuesto estrategias de nutrición precoz que pretenden evitar el estado catabólico que acontece en los primeros días de vida. La ausencia de alimento en el tracto gastrointestinal (TGI) produce atrofia de la mucosa y vellosidades y reduce la cantidad de enzimas necesarias para la digestión y absorción de sustratos; por lo tanto, no es de extrañar que la nutrición enteral mínima estimule el desarrollo gastrointestinal y mejore la tolerancia alimentaria (Mosqueda et al., 2008).

Cada vez existe menos controversia sobre el inicio de la nutrición enteral precoz en los RN con peso inferior a 1.500 g. La nutrición enteral mínima es un término que refleja el intento de facilitar la maduración estructural, funcional y microbiana de un intestino inmaduro mediante la administración de pequeñas cantidades de leche, además de la nutrición parenteral suministrada rutinariamente (Cilieborg et al., 2012). Diversos autores recomiendan el inicio de la nutrición enteral precoz con volúmenes que oscilan entre los 4-12 ml/kg/día de leche cada 2 horas por sonda intragástrica mientras se reduce la nutrición parenteral (Tudehope, 2013). Se ha observado que los prematuros que reciben nutrición enteral mínima desarrollan un tránsito intestinal más rápido y patrones de motilidad intestinal normales en menor tiempo, lo que se traduce en mejor tolerancia digestiva y un menor tiempo para alcanzar la nutrición enteral completa (Edmond y Bahl, 2008; Mosqueda et al., 2008).

II.1.6.1 Lactancia materna

La leche materna es el alimento ideal durante los primeros meses de vida. Su composición, extremadamente compleja, es distinta en cada especie de mamífero y, dentro de una especie, varía dependiendo del individuo (base genética, estado de salud, dieta, lugar de residencia...), la EG, el periodo de lactancia, el ritmo circadiano, la fracción de la toma y otros muchos factores (Ballard y Morrow, 2013). Existe actualmente evidencia sólida que demuestra que la leche materna (fortificada cuando sea necesario) es la mejor opción para los niños de cualquier EG, incluyendo los prematuros, en quienes sus beneficios antiinfecciosos, inmunológicos, neurológicos, emocionales y económicos adquieren especial relevancia (Agostoni et al., 2009; Eidelman, 2012; Lee da et al., 2012; Schanler, 2011; Schanler, 2007; Wight et al., 2008).

Los beneficios de la leche materna para los niños prematuros incluyen un vaciado gástrico más rápido (Ewer y Yu, 1996; Schanler et al., 1999), una tolerancia más rápida a la alimentación enteral y una reducción de la necesidad de nutrición parenteral (Schanler, 2000), una mejora en la absorción de nutrientes (Hamosh, 1994), un mejor desarrollo visual y cognitivo (DiBiasie, 2006; Hart et al., 2003; Sacker et al., 2006; Schanler et al., 2005) y la reducción de la incidencia de NEC, sepsis y otras infecciones (Chauhan et al., 2008; Lucas y Cole, 1990; Ronnestad et al., 2005; Sisk et al., 2007). Probablemente, estos efectos sean debidos a la acción combinada de los nutrientes y una variedad de factores bioactivos presentes en el calostro y la leche materna, tales como inmunoglobulinas, células inmunocompetentes, ácidos grasos antimicrobianos, poliaminas, oligosacáridos, lisozima, lactoferrina y otras glicoproteínas, péptidos antimicrobianos y bacterias comensales y potencialmente probióticas (Ballard y Morrow, 2013; Fernandez et al., 2013) (Tabla 6).

La EG también puede influir en la concentración de nutrientes y compuestos bioactivos, de tal manera que, en general, la leche de las madres de prematuros está particularmente adaptada para satisfacer las necesidades específicas de esa población (Dvorak et al., 2003; Koenig et al., 2005; Moltó-Puigmartí et al., 2011; Montagne et al., 1999; Schanler et al., 2005; Zhang et al., 2013) (Tabla 7).

Tabla 6. Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana^a

Proteínas y péptidos	Caseínas α y β	Transporte de minerales (Ca, Fe, Zn, Cu) Precusores de péptidos bioactivos
	Glicomacropéptido	Actividad antiviral Factor bifidogénico Precursor de péptidos bioactivos
	Proteínas del suero:	
	• Lactoferrina	Absorción de hierro Actividad antimicrobiana y antioxidante Inmunomodulación Actividad anticarcinogénica
	• Lisozima	Actividad antimicrobiana (efecto sinérgico con Igs y lactoferrina)
	• Inmunoglobulinas (sIgA, IgG, IgM)	Protección inmunológica
	• α -Lactalbúmina	Síntesis de lactosa en glándula mamaria Transporte de Ca Actividad anticarcinogénica (induce apoptosis de tumores) en asociación con el ácido oleico
	• Otras enzimas: glutatión peroxidasa, catalasa, superóxido dismutasa	Actividad antioxidante
Lípidos	Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga: ácidos araquidónico y docosahexanoico	Desarrollo neurológico, cognitivo y de la función visual
	Ácidos grasos de cadena corta	Actividad antimicrobiana Actividad anticarcinogénica Protección del epitelio intestinal
	Ácido linoleico conjugado	Actividad anticarcinogénica Factor de crecimiento
Glúcidos	Lactosa	Prebióticos
	Oligosacáridos	Inmunomodulación
	Mucinas	Ligandos para microorganismos
Otros	Poliaminas	Maduración y desarrollo del epitelio intestinal Inmunomodulación
	Nucleótidos y nucleósidos	Inmunomodulación Desarrollo y funcionamiento del epitelio intestinal Metabolismo lipídico
	Hormonas y factores de crecimiento	Regulación de distintas funciones
	Microbiota comensal (probióticos)	Colonización del intestino Protección frente a infecciones Desarrollo del sistema inmunitario Desarrollo cognitivo
	Células del sistema inmunitario	Protección inmunológica
	Membrana del glóbulo graso	Inhibición de infección por virus

^aAdaptado de Donovan, 2006 y Hamosh, 2001.

Tabla 7. Composición de la leche de transición y madura de las madres de recién nacidos prematuros en comparación con la leche madura las madres de los nacidos a término.

	Leche de transición RN prematuro (6 – 10 días)	Leche madura RN prematuro (30 días)	Leche madura RN a término (>30 días)
Macronutrientes			
Energía (Kcal/l)	660 ± 60	690 ± 50	640 ± 80
Proteínas (g/l)	19 ± 0,5	15 ± 1	12 ± 1,5
Grasa (g/l)	34 ± 6	36 ± 7	34 ± 4
Carbohidratos (g/l)	63 ± 5	67 ± 4	67 ± 5
Minerales			
Calcio (mmol/l)	8 ± 18	7,2 ± 1,3	6,5 ± 1,5
Fosforo (mmol/l)	4,9 ± 1,4	3 ± 0,8	4,8 ± 0,8
Magnesio (mmol/l)	1,1 ± 0,2	1 ± 0,3	1,3 ± 0,3
Sodio (mmol/l)	11,6 ± 6	8,8 ± 2	9 ± 4
Potasio (mmol/l)	13,5 ± 2,2	12,5 ± 3,2	13,9 ± 2
Cloro (mmol/l)	21,3 ± 3,5	14,8 ± 2,1	12,8 ± 1,5
Hierro (mg/l)	0,4	0,4	0,4
Zinc (µmol/)	58 ± 13	33 ± 14	15 - 46
Vitaminas			
A (UI/l)	500 – 4000	500 – 4000	600 – 2000
E (mg/l)	2,9 – 14,5	2,9 – 14,5	2 – 3
K (µg/l)	0,7 – 5,3	0,7 – 5,3	1,2 – 9,2
D (UI/l)	40	40	40
Folato (mg/l)	33	33	1,8

Valores de algunos nutrientes expresados en medias ± desviación estándar o en valores extremos.

Fuente: Bustos, (2008).

Recientemente se ha observado que el calostro de madres de RN muy prematuros poseían concentraciones más elevadas de diversos compuestos inmunológicos (incluyendo IgA, IL-6, TNF- α , IL-4, IL-17, MCP-1, MIP-1 β , IL-5, IL-7 o G-CSF) que las observadas en muestras de calostro de mujeres con embarazos a término (Espinosa-Martos et al., 2014; Espinosa-Martos et al., 2013). Previamente ya se había descrito que la inmunoprotección proporcionada por el calostro y la leche (aún siendo notable) disminuye a medida que aumenta la EG (Castellote et al., 2011; Koenig et al., 2005; Montagne et al., 1999). El proceso de maduración de la glándula mamaria parece ser paralelo al del feto, primero, y al del lactante, después; de hecho, el cierre de las zonas de oclusión del epitelio mamario se retrasa tras un nacimiento prematuro. Esto sugiere que el calostro y la leche pueden ser especialmente protectores para los niños muy prematuros, una población con mayor riesgo de intolerancia alimentaria e infecciones (Thompson y Bizzarro, 2008; Westerbeek et al., 2006). En consecuencia, sería muy conveniente iniciar la alimentación enteral de los RN prematuros utilizando el calostro de la propia madre ya que es un procedimiento sencillo, barato y bien tolerado incluso por los RN más prematuros y más enfermos (Rodríguez et al., 2010).

El caso del mioinositol es otro buen ejemplo de la adaptación de la leche materna a la EG del neonato. En contraste con la lactosa o glucosa, la concentración de este carbohidrato disminuye significativamente durante los primeros 4 días de lactancia (Espinosa-Martos et al., 2013; Jóźwik et al., 2013; Pereira et al., 1990; van Beusekom et al., 1993). El inositol promueve la maduración de varios componentes del surfactante y puede desempeñar un papel crítico en la vida fetal y neonatal (Howlett et al., 2012). En un estudio pionero, Bromberger y Hallman (1986) encontraron grandes diferencias en la concentración de inositol de diversas fuentes de alimentación infantil (calostro de madre de niño prematuro, calostro de madre de niño nacido a término; leche madura, fórmulas infantiles, nutrición parenteral). De todas ellas, el calostro de madres de niños prematuros tenía la mayor concentración de inositol y era significativamente mayor que la existente en el calostro de madres que dieron a luz a término (Bromberger y Hallman, 1986). Los resultados de dos trabajos recientes confirman estos hallazgos (300,59 y 243,28 mg/l en calostro de madre de prematuro y de madre de niño a término, respectivamente) (Espinosa-Martos et al., 2014; Espinosa-Martos et al., 2013).

La administración de inositol a niños prematuros con SDRA que reciben nutrición parenteral durante la primera semana de vida se asocia con un aumento de la supervivencia sin displasia broncopulmonar y con una disminución de la incidencia de la retinopatía del prematuro (Bromberger y Hallman, 1986; Hallman et al., 1992). Recientemente, una revisión Cochrane llegó a la conclusión de que la complementación de la dieta de prematuros con mioinositol conduce a reducciones estadísticamente significativas y clínicamente relevantes en la tasa de diversas complicaciones típicamente asociadas a estos niños (Howlett et al., 2012).

Por otra parte, el porcentaje de mujeres con una microbiota detectable en leche es significativamente menor entre las madres de niños prematuros que entre las de nacidos a término (Espinosa-Martos et al., 2014). Este hecho puede deberse a dos razones; en primer lugar, se ha señalado que la microbiota mamaria se forma en las últimas semanas del embarazo a través de una ruta entero-mamaria que implica complejas interacciones entre bacterias y monocitos en el intestino de la gestante (Jeurink et al., 2013; Perez et al., 2007). Por lo tanto, el proceso de colonización de las glándulas mamarias no se ha completado, cuando menos, en las madres de prematuros extremos. En segundo lugar, el porcentaje de madres de prematuros que reciben antibioterapia es muy elevado y muy recientemente se ha observado que la detección de lactobacilos o bifidobacterias es significativamente menor en muestras de leche de mujeres que habían recibido antibioterapia durante el embarazo o la lactancia (Soto et al., 2014). Es bien sabido que los antibióticos son responsables de disbiosis en la microbiota humana y cada vez es más evidente que la antibioterapia durante el embarazo, el parto y la lactancia altera la microbiota materna (Murk et al., 2011).

Entre las medidas para la promoción y el soporte de la lactancia materna en madres de niños prematuros, destacan las siguientes (Bustos, 2008):

(a) *Participación de los padres en los cuidados*. La participación continua de los padres en los cuidados en la Unidad Neonatal mejora la tasa de lactancia materna y acorta la estancia hospitalaria.

(b) *Método de la madre canguro*. Se puede definir como el contacto piel con piel entre madre y RN prematuro lo más precoz, continuo y prolongado posible con

lactancia materna, para que madre y RN se beneficien de sus ventajas. Se trata de un sistema aconsejable para prematuros de cualquier EG, de cualquier peso y con cualquier tipo de enfermedad, mientras sea tolerado por el binomio madre-hijo y por la Unidad Neonatal (Cattaneo et al., 1998; Ludington-Hoe y Swinth, 1996; Papí et al., 2007). Entre las ventajas de este método se incluyen las siguientes: facilita la lactancia materna y un apego más rápido, mejora la temperatura del RN y disminuye el estrés en el neonato y la madre, las infecciones y la morbilidad entre los RN prematuros. Sin embargo, solo el 40,9% de los centros hospitalarios que cuentan con UCIN en España han implementado el método madre canguro, según el último informe publicado en 2012 por el *European Science Foundation Network* sobre “Participación de los Padres y Método Canguro en UCI neonatales europeas”. Una cifra muy alejada del 100% que registran Gran Bretaña, Suecia, Dinamarca o Países Bajos e, incluso países como Francia, con un 73% de aplicación, o Italia, que ya ha alcanzado un 80% de implantación en sus servicios de UCIN.

(c) *Succión no nutritiva*. La succión del pecho vacío, tras la extracción de leche, puede favorecer la lactancia materna al alta. La succión de tetina es placentera en los pretérminos de menos de 32 semanas, no interfiere con la lactancia posterior y acorta la estancia hospitalaria, pero no mejora el crecimiento.

(d) *Consejos sobre lactancia y apoyo continuado en el hospital y en el domicilio*. No hay estudios de eficacia del consejo en pretérminos de menos de 32 semanas, pero sí en pretérminos de más de 32 semanas y en nacidos a término, donde está bien contrastada.

(e) *Alta precoz*. Existe una amplia experiencia en España y en otros países con los programas de alta precoz con apoyo en domicilio. Suelen incluir a pretérminos con menos de 2.000 – 2.200 g capaces de alimentarse por vía oral y estables. Son seguros y muy satisfactorios para los padres y los niños. También se favorece el mantenimiento de la lactancia y se acorta la estancia hospitalaria.

II.1.6.2 Leche materna donada

La leche materna donada (LMD) por otras madres se convierte en la mejor alternativa si, por cualquier motivo, no se dispone de leche de la propia madre (American Academy of Pediatrics, 2012; Arslanoglu et al., 2013). A corto plazo, los RN alimentados con LMD presentan una menor incidencia de NEC e infecciones nosocomiales y una mejor tolerancia digestiva que los alimentados con fórmulas artificiales (Boyd et al., 2007; Narayanan et al., 1984; Quigley et al., 2007). A largo plazo, presentan un mejor neurodesarrollo y un menor riesgo cardiovascular (Singhal et al., 2001; Singhal et al., 2004). Desde un punto de vista económico el uso de LMD supone un importante ahorro del gasto sanitario (Arnold, 2002). Así, por ejemplo, por cada euro invertido en LMD la unidad neonatal se ahorra entre 6 y 19 euros sólo en costes directos. Se ha observado que la apertura de un banco de leche no disminuye la tasa de lactancia materna y sí disminuye significativamente la exposición a fórmulas artificiales en las primeras 4 semanas de vida (Utrera Torres et al., 2010). Dados los riesgos conocidos asociados al uso de fórmulas artificiales en RN de riesgo alto, sería éticamente cuestionable su empleo en un grupo control en aquellas unidades neonatales que dispongan de LMD. Por ello, parece que es el momento de aceptar los beneficios probados y potenciales de la LMD y el fomento de su uso para que se

convierta en el estándar de alimentación de aquellos neonatos de riesgo alto que no disponen de la leche de su propia madre (García-Lara et al., 2012).

Dado que gran parte de las muestras biológicas analizadas en esta Tesis Doctoral se obtuvieron en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre de Madrid, a continuación se describirá su Banco de Leche, que fue el primero que se abrió en España con gestión pública. En el año 2000 surgió en dicho Servicio la iniciativa de abrir un banco de leche. Durante los años 2000 y 2004 se realizaron visitas a distintos bancos de leche del mundo, se revisó la bibliografía publicada al respecto y se analizaron los distintos modelos de banco existentes. Se elaboró un proyecto que se presentó a la Dirección del Hospital, a la CAM y al Ministerio de Sanidad con la finalidad de conseguir la financiación necesaria para ponerlo en marcha. En el año 2006, el Ministerio de Sanidad incluyó la donación de leche materna dentro de las líneas financiables a través de los fondos de cohesión para la mejora de la atención perinatal. La Consejería de Sanidad de la CAM valoró positivamente el proyecto del banco de leche materna y se adjudicaron los fondos suficientes a través de un programa del Ministerio de Sanidad para poner en marcha la iniciativa.

En diciembre de 2007 se abrieron las puertas del Banco de Leche Humana del Hospital 12 de Octubre (BLHDO). Los objetivos principales con los que se abrió fueron recoger, almacenar, pasteurizar, controlar y dispensar leche materna donada para niños enfermos bajo prescripción médica con garantía de calidad y seguridad; promocionar la lactancia materna y fomentar su donación para los niños enfermos; evaluar y difundir la experiencia mediante la elaboración de guías y documentos propios, la recogida sistemática de datos y el apoyo a otros bancos de leche en España; desarrollar proyectos de investigación, y abastecer de leche a otros servicios de la CAM (Vázquez Román et al., 2009).

La donación de leche para el BLHDO es voluntaria y altruista. La donación se puede iniciar en cualquier momento de la lactancia, pero se recomienda esperar entre 3 y 8 semanas desde el parto para que la lactancia esté correctamente establecida. No hay límite superior en los meses que una mujer puede estar donando. A todas las posibles donantes se les realiza una entrevista personal acerca de hábitos de vida y estado de salud, y se extraen muestras para el análisis serológico de VIH, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C y sífilis. Se les dan normas de extracción y conservación de la leche tanto de forma oral como escrita, al igual que acerca de la importancia del adecuado control de la cadena de frío. Firman un consentimiento y se les informa acerca del destino final de su leche y que pequeñas cantidades podrían dedicarse a la investigación, si así lo consienten. Se les suministra un sacaleches, si no tienen uno propio, recipientes de cristal estériles, etiquetas para identificar los botes y una nevera portátil para el transporte de la leche. La extracción de leche se puede realizar en el domicilio, conservarla congelada y transportarla al BLHDO como máximo cada 15 días, siempre y cuando dispongan de congeladores adecuados.

Cuando se recibe la leche, se comprueba que los recipientes sean adecuados, que estén en buenas condiciones y correctamente etiquetados y que la leche esté bien congelada. Una vez registrados, se almacenan en congeladores a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. La leche que se va a pasteurizar se descongela en un baño María ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$), bajo vigilancia estricta. La descongelación se para en el momento en que queda un bloque central de hielo que sea aproximadamente el 50% del total de la leche. No se mezcla la leche de distintas donantes. Una vez descongelada, lo primero que se hace es olerla, ya que el *off-flavor*,

o el olor no debido a las características organolépticas, es un reflejo de las alteraciones en la composición debidas al almacenamiento. Se rechazan aquellas leches con olor a pescado o a rancio. Posteriormente se analiza la acidez Dornic, que se correlaciona de forma positiva con el grado de contaminación bacteriana de la leche (a mayor acidez, mayor contaminación), y el crematocrito, que es la proporción de crema (la grasa y parte de las proteínas), a partir del que se hace un cálculo de las calorías. Queda, por tanto, la leche clasificada en función de 2 características: la acidez y las calorías, y así se puede adecuar la leche a cada receptor en función de sus necesidades. Se desecha la leche con acidez igual o superior a 8.

La leche de cada una de las donantes se divide en alícuotas de 30, 60 o 120 ml. La leche se pasteuriza por el método Holter (30 min a 62,5 °C) y el enfriamiento posterior debe ser lo más rápido posible para evitar la pérdida de propiedades. Durante todo el procedimiento se monitoriza la temperatura de la leche en un recipiente testigo y se registra. Una vez finalizada, se toma una muestra de la leche para su cultivo microbiológico y se vuelve a congelar a -20 °C hasta el momento de su dispensación. El tiempo máximo de almacenamiento postpasteurización es de 3 meses.

Los receptores habituales de LMD son los niños prematuros menores de 32 semanas de gestación o menores de 1.500 g, cuyas madres no pueden proporcionar suficiente leche por diferentes razones. Otros receptores son niños con enfermedad quirúrgica abdominal, cardiopatías con bajo gasto cardíaco y otras enfermedades con riesgo de NEC. La administración se hace siempre bajo prescripción médica.

Los bancos de leche humana deben controlar la seguridad de la LMD y tratar de preservar al máximo posible sus propiedades nutricionales y biológicas. Por ello, el BLHDO tiene implantado el sistema de análisis de peligros y puntos de control críticos (APPCC) utilizado en la industria alimentaria y, además, en junio de 2010 obtuvo la certificación de su sistema de gestión de calidad según la norma UNE-EN ISO 9001. Este sistema abarca todos los procesos llevados a cabo en el banco de leche desde la promoción de la donación hasta la distribución interna a los receptores (neonatos ingresados). Además, se sigue un sistema de trazabilidad de las muestras de LM tan riguroso como el empleado para la donación y la recepción de sangre. La implantación del sistema de gestión de calidad permite un control riguroso y una mejora continua de todos los procesos implicados. La satisfacción de las madres donantes y de los profesionales sanitarios que usan y prescriben la LMD es también un punto clave integrante de este sistema de gestión de calidad. Entre las mejoras obtenidas tras la implantación podría citarse la importante disminución de las pérdidas de leche cruda al conseguir optimizar la eficiencia de la pasteurización.

Las asociaciones internacionales de bancos de leche fomentan y apoyan la investigación en leche humana y bancos de leche. Hasta el momento, hay mucho que se desconoce en relación con la LMD, los posibles contaminantes que puede contener y la repercusión que tiene el almacenamiento en congelación y el procesamiento térmico en los macronutrientes, micronutrientes y en el amplio abanico de compuestos biológicamente activos que contiene la leche humana. Así, por ejemplo, con relación al consumo de tóxicos y medicamentos por parte de la donante solo se realiza una encuesta de salud, por lo que resulta fundamental una validación de los cuestionarios de hábitos de salud (Escuder-Vieco et al., 2013). Por otro lado, aunque algunos nutrientes y compuestos bioactivos presentes en la leche humana fresca permanecen activos después de dicho tratamiento térmico, la actividad biológica de otros se ve

afectada en mayor o menor medida (Fidler et al., 1998; Gómez de Segura et al., 2012; Koenig et al., 2005; Tully et al., 2001). Además, la leche materna es una fuente de bacterias comensales y potencialmente probióticas, que parecen desempeñar un papel importante en la colonización inicial del intestino humano (Fernandez et al., 2013) y que resultan destruidas por la pasteurización.

Conocer bien las limitaciones de la LMD sería de mucha utilidad para tratar de complementarla y/o establecer fechas de caducidad más adecuadas. Actualmente, los bancos no tienen criterios comunes en algunos de los procedimientos utilizados y tampoco en los tiempos de caducidad. Conocer mejor la repercusión que todo ello tiene en la calidad y la seguridad de la leche podría ayudar a unificar criterios. Además, se está intentado encontrar otros tratamientos para evitar la destrucción o desnaturalización de ciertos componentes bioactivos de la LMD que conlleva la pasteurización. Por todo ello, la investigación es fundamental en los bancos de leche.

II.1.6.3 Fortificantes de la leche humana

En el prematuro extremo, la leche humana sin fortificar puede resultar suficiente en las dos primeras semanas de vida pero, posteriormente, suele ser nutricionalmente insuficiente por déficit de proteínas, calcio, fósforo y sodio, por lo que debe ser complementada (Henderson, 2005). Con su uso, el pretérmino menor de 32 semanas consigue una mayor velocidad de crecimiento y masa ósea. Los fortificantes de leche humana son productos en polvo o líquidos con diferentes composiciones. Todos contienen proteínas o aminoácidos, carbohidratos, minerales y vitaminas en diferentes cantidades, con el objetivo de que la leche humana complementada aporte entre 80 y 85 kcal/100 ml y mayor cantidad de sodio, calcio y fósforo (Bustos, 2008). Los tres comercializados en España se comparan en la Tabla 8.

Habitualmente se utilizan una vez que se ha alcanzado la alimentación enteral exclusiva con buena tolerancia. Se empieza con una concentración baja (1 - 2 gramos por 100 ml de leche) y se aumenta diariamente hasta alcanzar la cantidad deseada o la cantidad máxima recomendada por el fabricante. Las evidencias disponibles recomiendan individualizar la fortificación en cada RN para conseguir los aportes de energía recomendados en cada momento (Di Natale et al., 2011; Senterre y Rigo, 2011). En relación a la cantidad de proteínas administradas, existen dos procedimientos distintos, uno mediante una fortificación estándar, analizando la cantidad de proteína de la leche materna, y otra mediante una fortificación adaptada a la respuesta metabólica del RN basada en el estudio del nitrógeno ureico en sangre (Arslanoglu et al., 2010). Dependiendo de la presentación y de la cantidad de leche a administrar pueden ser más o menos fáciles de dosificar. Una vez añadido el producto a la leche, se empieza a hidrolizar la dextrinomaltosa, aumentando en unas horas la osmolaridad. Por este motivo, la leche fortificada no se debe almacenar más de unas pocas horas

Tabla 8. Suplementos comerciales para la leche humana administrada a recién nacidos prematuros.

	FM85® (Nestlé)	Eoprotin® (Milupa)	Efamil® (Mead-Johnson)
Composición	1 g (sobres 1 g)	1 g (polvo en lata)	0,71 g (sobres)
Proteínas (g)	0,2	0,19	0,275
Tipo	Seroproteínas hidrolizadas	Hidrolizadas (caseína/suero 40/60)	50% Caseína no hidrolizada 50% Seroproteína hidrolizada
Carbohidratos (g)	0,66	0,715	<0,1
Tipo	Dextrinomaltosa	Dextrinomaltosa	Polímeros de glucosa, lactosa
Grasas (g)	0,004	0	0,25
Tipo	Lecitina de soja	-	30% aceite de soja, 70% TCM
Valor energético			
kJ	14,77	15,35	14,75
kcal	3,5	3,61	3,5
Vitamina A (µg ER)	30	30,9	72,5
Vitamina D (µg)	0,5	1,2	0,95
Vitamina E (mg ET)	0,4	0,62	0,775
Vitamina K (µg)	0,8	1,5	1,1
Vitamina C (mg)	2	2,85	3
Tiamina (µg)	10	31	37
Riboflavina (µg)	20	40	55
Niacina (mg)	0,16	0,58	0,75
Vitamina B6 (µg)	10	26	28
Acido fólico (µg)	8	11,9	6,25
Vitamina B12 (µg)	0,02	0,048	0,045
Biotina (µg)	0,6	0,6	0,67
Ác. pantoténico (mg)	0,08	0,18	0,18
Sodio (mg)	4	2,35	4
Potasio (mg)	8,4	1,84	7,25
Cloro (mg)	3,4	1,66	3,25
Calcio (mg)	15	15,45	22,5
Fósforo (mg)	9	10,70	12,5
Magnesio (mg)	0,48	1,43	0,25
Hierro (mg)	0,26	0	0,36
Zinc (mg)	0,16	0,095	0,18
Cobre (µg)	8	6,2	11
Yodo (µg)	3	2,61	0
Selenio (µg)	0,3	0	0
Manganeso (µg)	1	1,9	2,5
Colina (mg)	0,12	0	0
Inositol (mg)	0,13	0	0
Osmolaridad (mOsm/l)	363 (al 5%)	355 (al 4,2%)	
Osmolalidad (mOsm/kg H ₂ O)		394	323 (al 2,84%)

Composición por cada gramo de producto (obtenida de los fabricantes).
Fuente: Bustos, (2008).

II.1.6.4 Fórmulas infantiles

Las fórmulas infantiles representan la tercera opción, en orden de prioridad, para la alimentación de los prematuros y únicamente se deberían emplear cuando no sean posibles ninguna de las dos opciones anteriores (leche de la propia madre y LMD) ya que aumentan los riesgos a corto y largo plazo. En caso de utilizarse, hay evidencias de que las fórmulas específicas para neonatos pretérmino tienen beneficios sobre las fórmulas de inicio convencionales en los nacidos con menos de 32 semanas de gestación: mejor desarrollo psicomotor a los 18 meses, mejor crecimiento y mayor masa ósea (Bustos, 2008). Estas ventajas no se encuentran en etapas posteriores de la infancia. No se dispone de información válida para recomendar su uso en pretérminos de 32 ó más semanas de gestación.

La composición adecuada de estas fórmulas es aún objeto de controversia y la de cada marca comercial es ligeramente diferente, lo que refleja que los requerimientos nutricionales de los nacidos pretérmino no están definitivamente establecidos, especialmente en los más inmaduros y en los que tuvieron crecimiento intrauterino retrasado y, particularmente, en lo concerniente a la relación energía/proteína, la composición de las grasas y el contenido en calcio, fósforo, sodio, cloro, yodo y vitaminas A y D. En cualquier caso, la Tabla 9 muestra los requerimientos de proteínas y energía comúnmente aceptados según el peso al nacer (Ziegler et al., 2002).

Las fórmulas comercializadas en España tienen, según la concentración recomendada por el fabricante, entre 80 y 82 kcal/dl, aportan parte de los carbohidratos en forma de dextrinomaltoza y entre los lípidos se incluyen los ácidos araquidónico y docosahexaenoico (ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga). Hay estudios que sugieren que se obtienen mejores resultados neurológicos a corto plazo cuando se administran cantidades de ácido docosahexaenoico entre dos y tres veces superiores a las que tienen las fórmulas artificiales para prematuros que se comercializan actualmente (Lapillonne et al., 2013). Entre los minerales, contienen complementos de sodio, calcio y fósforo y suelen aportar también L-carnitina y mayor cantidad de algunas vitaminas e inositol. La composición de cada fórmula es fácilmente accesible en la publicidad de las empresas y en las correspondientes páginas web.

II.1.6.5 Nutrición parenteral y enteral

La progresión del RN prematuro hacia el ideal de alimentarse completamente a través del pecho de su propia madre puede pasar por una serie de etapas en las que se deban utilizar diferentes formas de nutrición: parenteral, enteral y oral.

La nutrición parenteral es necesaria en aquellos niños en los que la alimentación enteral pueda estar contraindicada debido a su inmadurez o a cualquier problema médico. Básicamente consiste en la administración por vía intravenosa de una solución de glucosa y aminoácidos con electrolitos, minerales y vitaminas, además de grasas como principal fuente de energía no proteica. Las soluciones se preparan normalmente en una farmacia especializada para reducir al mínimo el riesgo de contaminación microbiana. La bacteriemia es la complicación más común de la nutrición parenteral (Tabla 10). La administración mediante un catéter venoso central no se ha relacionado con mayores riesgos de infección que cuando se usan las vías periféricas. En las éstas

últimas, hay que tener cuidado con las lesiones por extravasación periférica. La infiltración subcutánea de una solución hipertónica e irritante puede causar ulceración local de la piel, infección secundaria y cicatrización.

Tabla 9. Requerimientos estimados de proteínas y energía para la alimentación enteral, por grupo de peso.

Peso RN (g)	500 -700	700 -900	900 -1200	1200 - 1500	1500 - 1800
Ganancia de peso fetal (g/kg/día)	21	20	19	18	16
Proteínas (g/kg/día)					
Pérdidas	1	1	1	1	1
Crecimiento	2,5	2,5	2,5	2,4	2,2
Necesidades (g/kg/día)	4	4	4	3,9	3,6
Energía (kcal/kg/día)					
Pérdidas	60	60	65	70	70
Basales en reposo	45	45	50	50	50
Otros consumos	15	15	15	20	20
Crecimiento	29	32	36	38	39
Necesidades	105	108	119	127	128
Proteína/energía (g/100 kcal)	3,8	3,7	3,4	3,1	2,8

Fuente: Ziegler et al., (2002).

La nutrición enteral se refiere a la administración intragástrica de cualquier líquido o alimento a través de una sonda de plástico que pasa a través de la nariz o la boca, directamente al estómago. Esta técnica se aplica en los menores de 32 semanas, pero se puede extender hasta las 34 - 35 semanas, dependiendo del estado de desarrollo. Para la inserción de estas sondas es necesario tener un buen entrenamiento previo. La sonda nasogástrica (SNG) se utiliza más que la orogástrica en los menores de 32 semanas porque es más fácil su fijación y mantenimiento. No obstante, las nasogástricas ocluyen parcial o totalmente un orificio nasal y aumentan la resistencia de las vías aéreas superiores y el riesgo de desaturación y apnea (Edmond y Bahl, 2008), por lo que no es conveniente su utilización en los prematuros que tienen una función respiratoria alterada.

Dado que los pretérminos con menos de 32 semanas de gestación no suelen tolerar la alimentación enteral en los primeros días de vida, durante años ha sido práctica habitual en muchos centros no iniciar la alimentación enteral en la primera semana de vida. Sin embargo, la administración de pequeñas cantidades de leche (de 5 a 20 ml/kg/día) desde el primer día no incrementa el riesgo de NEC y acorta el tiempo en que se alcanza la alimentación enteral completa y la hospitalización. A esta alimentación mínima se la conoce también como alimentación “trófica” para el intestino (Bustos, 2008).

Tabla 10. Complicaciones asociadas a la nutrición parenteral.

Complicaciones relacionadas con el catéter	Complicaciones metabólicas
Bacteriemia (estafilocócica)	Ictericia colestásica
Infección fúngica invasiva	Hiperglucemia o glucosuria
Trombosis	Déficits o excesos de vitaminas
Lesiones por extravasación	Hiperamonemia
Taponamiento cardíaco	

La administración intragástrica puede ser fraccionada (generalmente por gravedad o por bomba de jeringa) o continua (en 3 - 4 h) a través de una bomba de jeringa. No es conveniente que la alimentación continua se mantenga más de 4 horas porque los lípidos se adhieren a las paredes del tubo, disminuyendo su aporte. La alimentación fraccionada, dejando períodos de ayuno, parece acortar el tiempo en el que se alcanza la nutrición enteral completa en los pretérmino (Premji y Chessell, 2011). Un aspecto a considerar es el tiempo de administración del alimento por gravedad, es decir, en bolo. La capacidad gástrica de los pretérmino es limitada y el vaciado gástrico es lento. Cuando se alcanza la cantidad máxima de aporte enteral, la administración rápida puede producir distensión gástrica, dificultad respiratoria, regurgitación y, en ocasiones, apnea. En estos casos es preferible administrar el bolo en un tiempo más fisiológico, similar a la duración de una toma, es decir, unos 20 - 30 minutos. También hay que considerar la posibilidad de dar tomas de menor volumen pero más frecuentes (por ejemplo, 12 al día). En general se acepta que incrementos de hasta 20 ml/kg/día son seguros con cualquier tipo de leche, si no aparecen signos de intolerancia. Sin embargo, la práctica con leche humana en muchos centros es incrementar hasta 30 ml/kg/día en pretérminos estables, hasta alcanzar la alimentación enteral completa. Si no hay circunstancias clínicas que lo contraindiquen, y toleran estos aumentos progresivos, se puede conseguir nutrición enteral completa en la primera mitad de la segunda semana de vida.

Tanto en la fase de aumento de aportes enterales, como cuando se ha alcanzado la alimentación enteral completa deben vigilarse los signos de intolerancia: distensión abdominal clínicamente importante y vómitos (especialmente si son biliosos o sanguinolentos). Además cuando se aprecian signos de intolerancia digestiva franca, el íleo paralítico y la obstrucción intestinal, la alimentación enteral está contraindicada cuando existe inestabilidad hemodinámica, definida por la situación de shock o la hipotensión que precisa administración de dopamina a dosis de 10 µg/kg/minuto o superiores, porque en esta situación hay un grave compromiso del flujo sanguíneo mesentérico.

II.1.6.6 Monitorización del crecimiento y la ganancia ponderal

Hoy por hoy el objetivo de alcanzar un crecimiento similar al fetal en los pretérminos de ≤ 32 semanas no es realista. En la práctica habitual se considera que es muy importante monitorizar la velocidad de crecimiento y la ganancia ponderal, a pesar de que no está definido el estándar ideal para los pretérminos. La desnutrición

fetal, y probablemente la neonatal, pueden desencadenar mecanismos adaptativos, como la resistencia a la insulina que, perpetuados en edades posteriores, pueden conducir a mayor riesgo cardiovascular y menor esperanza de vida. Tampoco se sabe el tiempo óptimo para lograr el alcance de los valores normales de peso y longitud. La vigilancia se suele centrar en evitar, en lo posible, la desnutrición grave. Para este propósito, durante el ingreso hospitalario se utilizan habitualmente las curvas de Ehrenkranz (1999). Una vez alcanzada la edad postmenstrual correspondiente a 40 semanas, deben utilizarse gráficas poblacionales adecuadas. La OMS recomienda utilizar sus gráficas para todos los lactantes y niños pequeños, elaboradas con una muestra multiétnica de niños amamantados (OMS, 2009: <http://www.who.int/childgrowth/en/>).

II.2 LA MICROBIOTA INTESTINAL

A pesar de nuestra visión generalmente antropocéntrica del mundo, realmente es la población microbiana la que domina la vida en este planeta, tanto en diversidad global como en términos cuantitativos. El cuerpo humano aloja una multitud de bacterias, arqueas, virus y microbios eucariotas, que se distribuyen a lo largo de las mucosas y epitelios de diversos órganos y que, globalmente, conforman nuestra microbiota (Zhou et al., 2013). El término microbioma se emplea para la colección de genes y genomas aportados por la microbiota. Dentro de la microbiota humana, la que habita el intestino es la más compleja, ya que contiene virus y los dominios Archaea, Bacteria y Eukarya (Eckburg et al., 2005; Reyes et al., 2010), y también la numerosa, ya que los microorganismos que habitan en el intestino alcanzan las mayores densidades celulares registradas en cualquier ecosistema.

II.2.1 El intestino, un órgano peculiar

El intestino podría definirse como el “patito feo” de nuestro organismo. A simple vista, parece un órgano triste, gris e incluso decepcionante, resignado a jugar un papel secundario y eminentemente “escatológico”. Sin embargo, se trata de una de las partes de nuestro cuerpo que más sorpresas están deparando a la comunidad científica en los últimos años, de tal manera que actualmente aparece ante nosotros como un órgano realmente fascinante.

En primer lugar, hay que señalar que se trata de un órgano inmenso, con una longitud como la de un autobús y una superficie que podría cubrir perfectamente un campo de fútbol. Por él pasan continuamente grandes volúmenes de alimentos, sustancias químicas nocivas y microorganismos potencialmente patógenos. Es el encargado de llevar a cabo una operación de salvamento notablemente eficaz: el rescate de los nutrientes esenciales existentes en un magma intermitente de alimentos y agua. Para conseguirlo, tiene que conducir este contenido a una velocidad adecuada, aportar diversas secreciones, realizar labores de digestión, absorber los productos digeridos, los electrolitos y el agua, enviar este material hacia el torrente circulatorio y, finalmente, expulsar los productos de desecho.

Por si esto fuera poco, es el principal órgano del sistema inmunitario, realizando una concienzuda labor de muestreo del ambiente entérico y teniendo que mantener un difícil equilibrio: controlar con firmeza a los patógenos, tolerar a los comensales y originar respuestas proporcionadas frente a la multitud de antígenos con los que tiene contacto.

Pero hay más aún; el intestino mantiene un constante intercambio de información con el cerebro y con otros órganos a través de una compleja red de señales nerviosas, metabólicas y endocrinas. El sistema nervioso entérico es un vasto almacén químico en el que están representadas todas y cada una de las clases de neurotransmisores que operan en nuestro cerebro. Su cometido va mucho más allá de la supervisión de los ya de por sí complejos procesos digestivos e incluye la producción de sustancias psicoactivas. El “cerebro” entérico recibe en todo momento información desde el cerebro, pero nadie le dicta cómo debe trabajar. Es más, el flujo de mensajes intestino-cerebro supera con creces al que se produce en sentido inverso.

Sin ir más lejos, el 90 de las fibras del nervio vago son aferentes, es decir, que transmiten señales en dirección encefálica. Todas estas peculiaridades hacen del sistema nervioso entérico un lugar independiente de integración y procesamiento neural, razón por la que, desde hace unos años, se le considera nuestro “segundo cerebro” (Gershon, 1998). Un rico circuito intrínseco de neuronas sensitivas, interneuronas y neuronas motoras interconecta los diferentes niveles del intestino y coordina la actividad a lo largo de su recorrido. La gran riqueza de neurotransmisores liberados por las terminaciones nerviosas de las neuronas gastrointestinales sugiere que el lenguaje del sistema nervioso entérico es tan rico y complejo como el del cerebro. Resulta ilustrativo que el intestino sea precisamente el órgano en el que se pusieron de manifiesto, por primera vez, las conexiones físicas entre el sistema inmunitario y el sistema nervioso (Goehler et al., 1999).

Por otra parte, el intestino humano es el hogar de una cantidad casi inconcebible (alrededor de 100 billones) de microorganismos, un número 10 veces mayor que el de todas nuestras células somáticas y germinales juntas (Savage, 1977) y sin ellos no seríamos lo que somos. A pesar de ello, nuestra relación con los componentes de la microbiota se describe a menudo como “comensal” (un socio resulta beneficiado mientras que al otro no le afecta positiva ni negativamente) pero realmente se trata de una relación de mutualismo ya que ambos socios obtienen beneficios de la relación (Sommer y Bäckhed, 2013; Ursell et al., 2012). Por ejemplo, las bacterias del biorreactor intestinal degradan un variado menú de polisacáridos que, de otra manera, resultarían indigestibles, mientras que el hospedador les proporciona un delicioso *buffet* de polisacáridos en un agradable ambiente anóxico (Hooper et al., 2002). De hecho, las alteraciones de la composición de la microbiota (disbiosis) predisponen o conducen a diversos estados patológicos.

En consecuencia, sería más apropiado vernos a nosotros mismos como un conjunto de muchas especies, en el que nuestro bagaje genético está integrado tanto por los genes humanos como por el microbioma. El conjunto del genoma humano y del genoma de los distintos microorganismos que nos habitan constituye el metagenoma humano. En consecuencia, los humanos somos superorganismos cuyo metabolismo representa una amalgama de propiedades microbianas y humanas (Goodacre, 2007) (Figura 15).

Nuestra microbiota intestinal se comporta como un auténtico órgano (O'Hara y Shanahan, 2006): (1) está compuesta por diferentes “líneas celulares” con capacidad de comunicarse entre ellas y con el hospedador; (2) consume, almacena y redistribuye energía; (3) interviene en transformaciones químicas esenciales para la fisiología del hospedador; y (4) es capaz de mantenerse y repararse por sí misma mediante procesos de autorreplicación. De hecho, el microbioma intestinal (con un número de genes que puede ser más de 100 veces superior al de nuestro genoma) se encarga de toda una serie de funciones que, afortunadamente, nuestras células eucariotas no han tenido que adquirir durante el proceso evolutivo (Qin et al., 2010; Xu y Gordon, 2003). La microbiota no está aislada sino que se halla en una compleja y constante interacción bioquímica-inmunológica-neurológica con el resto de células y sustancias que habitan el intestino.

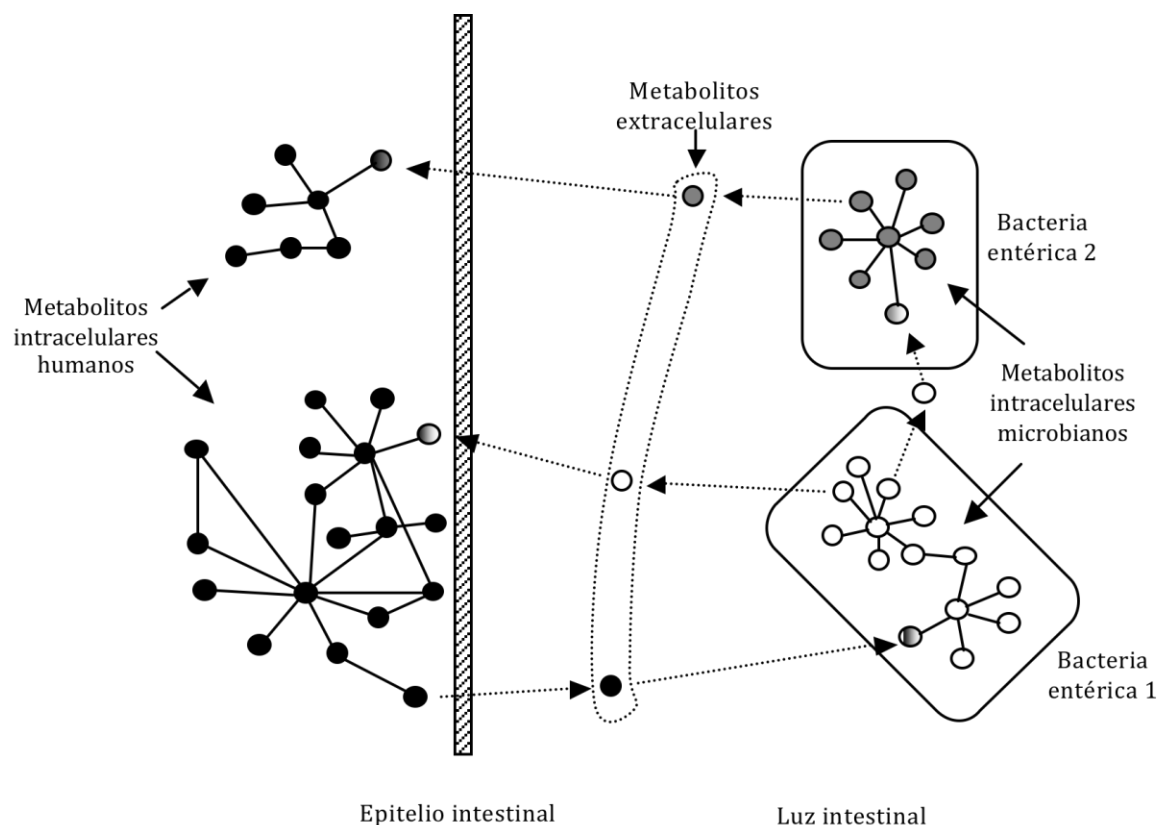


Figura 15. Representación esquemática de las complejas redes metabólicas de los superorganismos. Uno de los metabolitos derivados de la acción enzimática de proteínas codificadas en genes humanos (círculos negros) ha sido secretado al intestino, donde es usado como sustrato por una bacteria que reside en el intestino (bacteria entérica 1). Esta bacteria ha transformado este metabolito empleando sus propias enzimas. A su vez, dos de sus productos (círculos blancos) son secretados; uno de ellos atraviesa la barrera intestinal y es empleado por las células humanas mientras que el otro es absorbido por una segunda bacteria (círculos grises). Los procesos de transformación microbiana pueden conectar áreas del metabolismo humano que aparentemente no están asociadas. Fuente: Adaptado de Goodacre (2007).

II.2.2 Diversidad de la microbiota intestinal

La composición de la microbiota intestinal ha sido objeto de numerosas investigaciones durante las últimas décadas. Hasta los años 80, el estudio de la microbiota intestinal dependía de la continua mejora en los procedimientos de enriquecimiento y en los sistemas para la generación de ambientes anaerobios. Los aislados se identificaban y caracterizaban mediante la combinación de diversos ensayos fenotípicos. En un estudio pionero, Moore y Holdeman (1974) analizaron la microbiota fecal de 20 personas y, a pesar de que únicamente pudieron identificar 113 especies, estimaron que el número real podría ser superior a 400 (Moore y Holdeman,

1974). Los estudios subsiguientes confirmaron la gran diversidad bacteriana existente en el TGI mostrando la existencia de más de 400 especies. Los grupos dominantes identificados en esos estudios iniciales pertenecían a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus* y *Streptococcus* (que incluía entonces el género *Enterococcus*). El empleo de técnicas de cultivo, las únicas disponibles hasta hace pocos años, parecía sugerir que entre el 85 y el 99% de los microorganismos del TGI se podrían englobar en un máximo de unas 40 especies que constituirían la “microbiota normal” (Drasar y Barrow, 1985; Moore y Holdeman, 1974). Actualmente, las técnicas relacionadas con el gen 16S rRNA han revolucionado la visión proporcionada por los procedimientos clásicos basados en el empleo de medios de cultivo.

Sobre la base de las secuencias depositadas en el *GenBank* correspondientes a bacterias del intestino humano, se puede deducir que podrían existir al menos 800 especies distintas. Los análisis de diversidad a nivel de cepas indican que podrían coexistir más de 7.000 cepas bacterianas en el intestino humano (Backhed et al., 2005) (Figura 16). La diversidad presente en el TGI parece ser el resultado de un férreo proceso de selección y coevolución que actúa a dos niveles: (1) el microbiano, en el que las estrategias individuales de los microorganismos (tasa de crecimiento, utilización de sustratos...) afectan a su aptitud para vivir en un ensamblaje competitivo; y (2) el del hospedador, ya que una funcionalidad subóptima del “cóctel microbiano” puede reducir la aptitud del hospedador. Aquellos consorcios microbianos cuya actividad integrada resulte un coste para el hospedador provocarán la existencia de menos hospedadores y, en consecuencia, la pérdida de su propio hábitat. Por lo tanto, la diversidad del TGI humano reflejaría un proceso de selección de bacterias específicas (o, lo que es lo mismo, de sus genomas, transcriptomas, proteomas y metabolomas) cuyo comportamiento colectivo resulte beneficioso para el hospedador y confiera un cierto grado de elasticidad frente a distintos tipos de estrés. Es decir, se promueve activamente la cooperación y la estabilidad funcional del ecosistema intestinal.

Como se ha comentado anteriormente, la microbiota intestinal humana contiene bacterias, virus, arqueas (representadas especialmente por la especie metanogénica *Methanobrevibacter smithii*) y células eucariotas. Al nivel de filo, la microbiota de un adulto sano muestra una diversidad relativamente baja, ya que los representantes de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* constituyen más del 80% de la misma, mientras que *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* se encuentran en porcentajes mucho menores (Arumugam et al., 2011; Yatsunencko et al., 2012). Sin embargo, la microbiota intestinal posee una elevada diversidad si se consideran niveles taxonómicos más bajos (especie y cepa), albergando centenares de especies (con una media de más de 150 por individuo) y miles de cepas y mostrando una elevada variabilidad individual (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Qin et al., 2010).

A pesar de esta variabilidad interindividual, se ha observado que aproximadamente el 40% de los genes bacterianos presentes en el microbioma intestinal son compartidos por un elevado número de individuos (Qin et al., 2010). Es decir, existe un grupo de genes altamente conservados que conformarían un “microbioma común”, que serían redundantes en distintas especies bacterianas y que desempeñarían un papel clave en la salud del hospedador. Este microbioma común

posee una elevada estabilidad a lo largo del tiempo, aunque puede sufrir fluctuaciones en su composición o actividad metabólica como consecuencia de diversos factores, incluyendo cambios en la dieta, uso de antibióticos o situaciones de estrés (*Human Microbiome Project Consortium*, 2012; Jalanka-Tuovinen et al., 2011). Recientemente, se ha sugerido que las personas adultas se pueden clasificar en tres grandes grupos, o enterotipos, en función de su microbioma intestinal humano (Arumugam et al., 2011). Cada uno de ellos se caracteriza por la mayor abundancia relativa de uno de los siguientes géneros: *Bacteroides* (enterotipo 1), *Prevotella* (enterotipo 2) o *Ruminococcus* (enterotipo 3). Esta agrupación parece ser independiente del sexo, masa corporal o nacionalidad pero está fuertemente influida por la dieta (Wu et al., 2011). No obstante, son necesarios más estudios para confirmar si esta clasificación es universal o si existen personas con otros enterotipos.

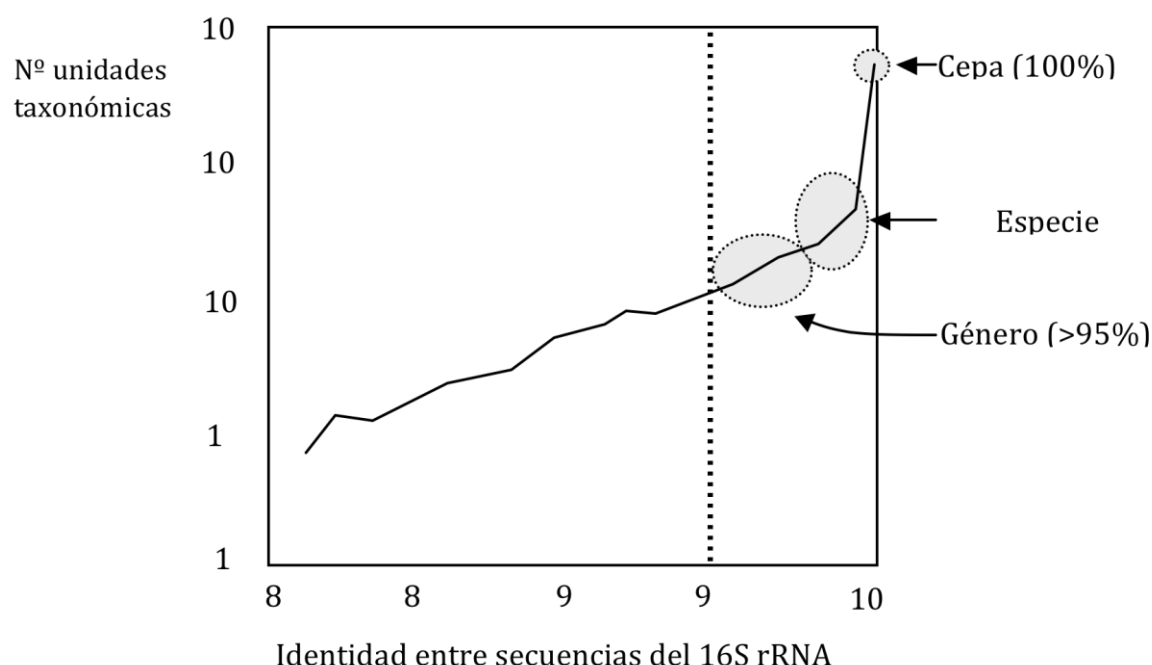


Figura 16. Estimación de la diversidad de especies y cepas existentes en el TGI humano a partir de las secuencias del 16S rRNA disponibles en la base de datos GenBank. Identidad de secuencias: (a) nivel “género” (>95%); (b) nivel “especie” (>98%); (c) nivel “cepa” (secuencias únicas). Adaptado de Backhed et al., (2005).

II.2.3 Adquisición y evolución de la microbiota intestinal infantil

La colonización microbiana del TGI infantil es un proceso esencial en nuestra vida puesto que cada vez resulta más evidente que las interacciones iniciales que se establecen entre la microbiota y su hospedador tienen consecuencias importantes para la salud a corto, medio y largo plazo.

II.2.3.1 Periodo fetal

Desde los estudios clásicos de Tissier (1900) sobre la adquisición de la microbiota intestinal infantil, se ha aceptado la idea de que los fetos son estériles *in utero* y que la colonización bacteriana del intestino se inicia durante el tránsito por el canal del parto, por contaminación a partir de la microbiota vaginal e intestinal de la madre (Isolauri et al., 2001; Mackie et al., 1999; Tannock, 1995), a pesar de la ausencia de evidencias científicas. Según dicha hipótesis, la composición inicial de la microbiota intestinal estaría determinada fundamentalmente por el tipo de nacimiento y la alimentación del RN (Mackie et al., 1999). Por su parte, la principal fuente de bacterias para los niños nacidos por cesárea sería el ambiente hospitalario, incluyendo el instrumental, los equipos y la presencia de otros neonatos y del personal médico (Lennox-King et al., 1976a; Lennox-King et al., 1976b).

Más de un siglo después, la hipótesis de que la barrera placentaria mantiene a los fetos estériles durante un embarazo saludable sigue siendo un dogma general. Este punto de vista se basa en el hecho de que, durante décadas, los análisis microbiológicos de muestras biológicas relacionadas con el embarazo (corioamnios, líquido amniótico, meconio...) se llevaban a cabo únicamente en aquellos casos en que los que la presencia de una infección intrauterina era evidente. De hecho, varios estudios han encontrado una fuerte correlación entre las infecciones intrauterinas y el parto prematuro (DiGiulio et al., 2008; Goldenberg et al., 2008).

Por el contrario, pocos estudios han examinado la microbiota uterina asociada a embarazos sanos a término, en parte debido a la perdurable influencia del paradigma del útero estéril, pero también a las dificultades éticas y técnicas para la obtención de muestras durante embarazos saludables. Sin embargo, estudios más recientes sobre la posible transmisión de bacterias a través de la barrera placentaria en condiciones fisiológicas han mostrado la existencia de bacterias en muestras de líquido amniótico, sangre de cordón umbilical y membranas fetales en ausencia de infección o inflamación (Bearfield et al., 2002; Jimenez et al., 2005; Jimenez et al., 2008c; Rautava et al., 2012). Por otra parte, el meconio tampoco es estéril, como se suponía anteriormente sino que alberga una compleja comunidad microbiana propia que difiere de la existente en las heces infantiles (Ardissone et al., 2014; Gosalbes et al., 2013; Hu et al., 2013; Jimenez et al., 2008c; Moles et al., 2013). Un trabajo reciente ha revelado que algunos microorganismos que colonizan la placenta, como *Prevotella* spp. y *Gardnerella* spp., pueden provocar respuestas inflamatorias específicas en los neonatos, mientras que otros, como *Lactobacillus* spp., pueden suprimir estas respuestas (Fichorova et al., 2011).

Para probar si ciertas bacterias intestinales maternas pueden colonizar el útero, dos estudios pioneros demostraron que la administración oral de una cepa marcada de *Enterococcus faecium* a ratonas gestantes daba lugar a su presencia en el líquido amniótico y meconio de las crías obtenidas por cesárea (Jimenez et al., 2005; Jimenez et al., 2008a). Los estudios citados anteriormente sugieren que la colonización bacteriana del intestino humano es un proceso complejo que se inicia, a pequeña escala, en las últimas fases del periodo fetal (Funkhouser y Bordenstein, 2013) (Figura 17).

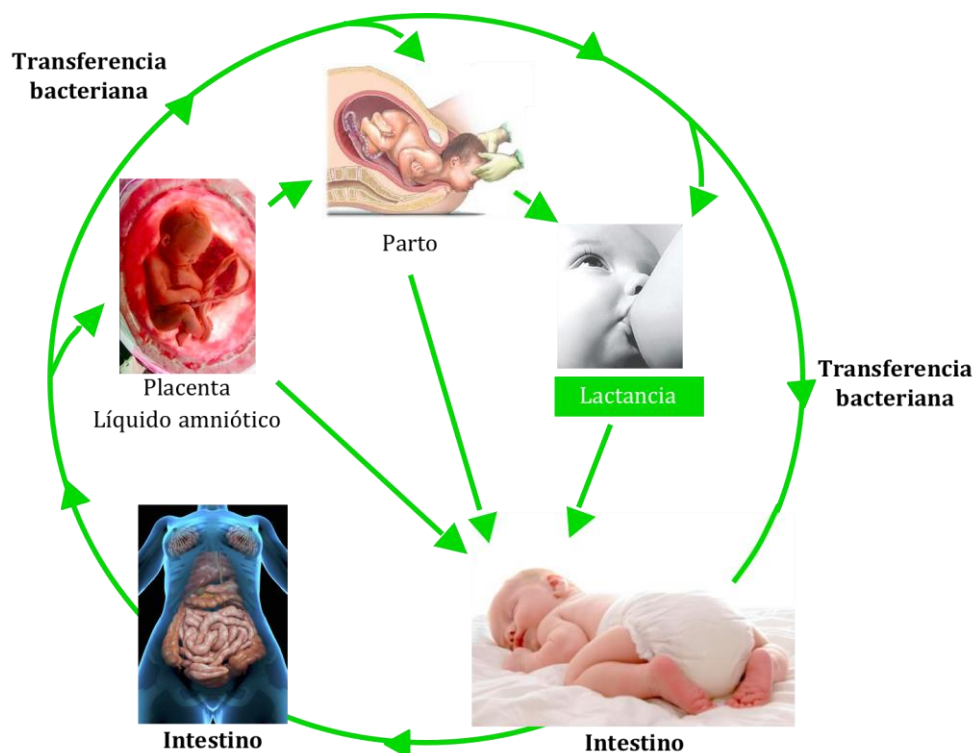


Figura 17. Fuentes de transmisión vertical de microorganismos entre la madre y su hijo durante el embarazo, parto y periodo posnatal.

II.2.3.2 Nacimiento y periodo posnatal

Tras el nacimiento, el proceso de colonización se intensifica drásticamente debido al contacto del neonato con microorganismos procedentes de las microbiotas vaginal, intestinal y/o mamaria de la madre y del medio ambiente que le rodea (Buddington et al., 2010; Mackie et al., 1999; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009). En consecuencia, diversos factores, como la composición de la microbiota materna, la EG, la forma y lugar de nacimiento, la medicación (particularmente la antibioterapia) o la alimentación, juegan papeles claves en un proceso del que dependen funciones tan importantes como la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos, el neurodesarrollo o la maduración del sistema inmunitario (Hooper y Gordon, 2001; Martino et al., 2008) (Figura 18).

Las primeras semanas de vida constituyen el periodo más dinámico en el ecosistema gastrointestinal. La microbiota infantil se caracteriza por concentraciones bacterianas más bajas que las existentes en el intestino de un adulto y con una menor tasa de *Firmicutes/Bacteroidetes* (Mariat et al., 2009). Además, en esta fase, diversas bacterias anaerobias facultativas (estreptococos, estafilococos, bacterias lácticas, enterobacterias) colonizan y dominan el intestino infantil (Jimenez et al., 2008b). La presencia de tales bacterias resulta crítica ya que son esenciales para la modulación inicial del sistema inmunitario y la creación de un ambiente reductor que permita el

desarrollo posterior de bacterias anaerobias estrictas, como las especies de *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Clostridium* y *Bifidobacterium* (Langhendries, 2006; Mackie et al., 1999; Sakata et al., 1985a) (Figura 19). Por todos estos motivos, existe un gran interés por conocer el desarrollo de la microbiota del intestino infantil y su influencia sobre el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma del niño. Alrededor de los tres años de edad, la microbiota intestinal del niño alcanza una composición relativamente estable, similar a la del adulto (Koenig et al., 2011; Yatsunencko et al., 2012).

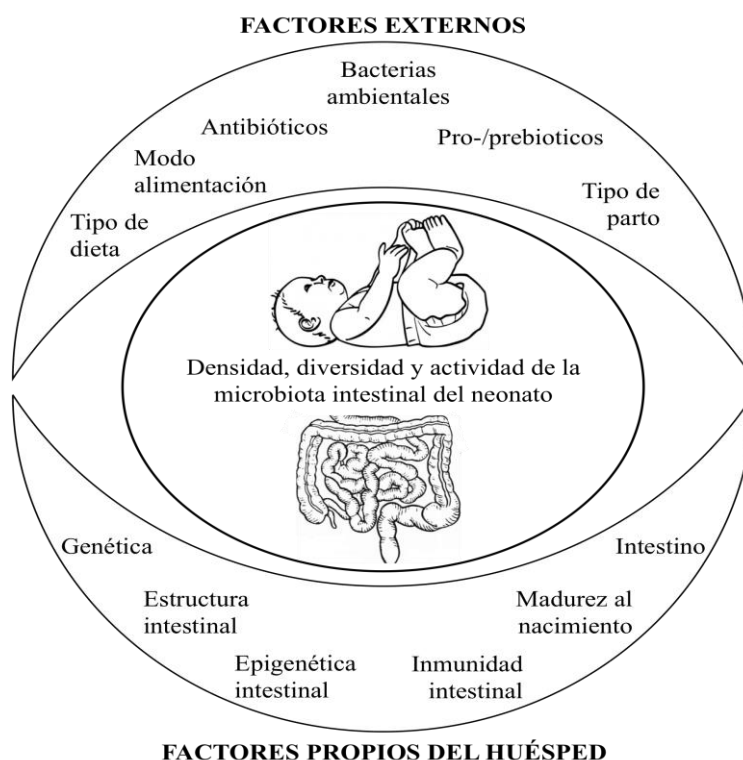


Figura 18. La colonización del intestino neonatal está determinada por factores externos e internos. Fuente: Adaptado de Cilieborg et al., (2012).

II.2.4 Relevancia de la adquisición de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal ejerce papeles esenciales para la fisiología de su anfitrión a pesar de que todavía desconocemos parte de tales funciones y/o los mecanismos responsables de las mismas.

En primer lugar, su función metabólica resulta obvia, no sólo por su acción metabólica directa sobre los componentes de la dieta sino también por la capacidad de regular la expresión de genes humanos implicados en el metabolismo de nutrientes (Hooper et al., 2002). Una de las principales funciones metabólicas de nuestra microbiota es la generación de nutrientes asimilables mediante la fermentación del mucus producido por el epitelio y de diversos compuestos que las células humanas no pueden digerir (oligosacáridos de la leche humana, celulosa, hemicelulosa, almidón resistente, pectinas...). El resultado final es la generación de ácidos grasos de cadena

corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, responsables de funciones muy importantes tanto al nivel intestinal como al sistémico (Guarner y Malagelada, 2003). No es de extrañar que la cuantificación de los AGCC (y, especialmente, del butirato) sea un marcador de la actividad metabólica de la microbiota intestinal. Recientemente, se ha observado que la microbiota de los niños con cólico del lactante se caracteriza por una menor cantidad de microorganismos productos de butirato que la de los niños sanos (de Weerth et al., 2013). La microbiota también es capaz de aportar aminoácidos y proteínas y participa en la biosíntesis de vitaminas, en la absorción de calcio, magnesio o hierro y en la detoxificación o eliminación de compuestos perjudiciales para la salud (Sanz et al., 2004). Globalmente, se considera que la actividad metabólica de nuestra microbiota es comparable a la del hígado (Shanahan, 2004).

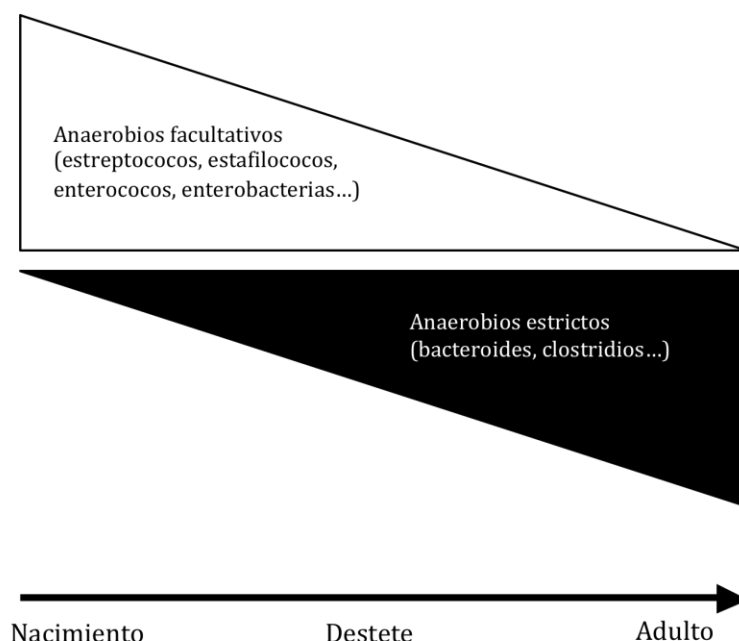


Figura 19. Ecología microbiana del intestino postnatal en mamíferos. Los anaerobios facultativos predominan en el intestino del neonato pero, tras el destete, empiezan a aumentar los anaerobios estrictos, que son predominantes en la comunidad estable que caracteriza al intestino del adulto.

Además, la microbiota es un elemento imprescindible en el mantenimiento de la función de barrera (Ashida et al., 2011; Leser y Mølbak, 2009; Mack et al., 2003), la proliferación, diferenciación y angiogénesis del epitelio intestinal (Hooper y Macpherson, 2010; Schirbel et al., 2013) o la estimulación del eje “intestino-cerebro” (Al-Asmakh et al., 2012; Marques et al., 2013). Diversos estudios epidemiológicos y ensayos *in vivo* han mostrado que el patrón de colonización del intestino en las primeras etapas de la vida influye de manera relevante en el desarrollo posnatal del sistema nervioso central y este hecho puede tener consecuencias a largo plazo (Begega et al., 2010; Collins et al., 2012).

Por otra parte, la adquisición de la microbiota intestinal es un factor fundamental para la maduración del sistema inmunitario innato y adquirido desde el mismo nacimiento. En este sentido, los receptores de reconocimiento de patrones (PRR; del inglés, *Pattern Recognition Receptors*), como los receptores de tipo Toll (TLR; del inglés, *Toll-Like Receptors*) o de tipo Nod (NLR; del inglés, *Nod-Like Receptors*), específicos del sistema inmunitario innato y expresados por las células eucariotas, son capaces de reconocer motivos microbianos muy conservados (Abreu, 2010; Cario, 2005). Esta interacción provoca una cascada de señalización celular que conduce a las distintas respuestas celulares responsables de dirigir la respuesta inmunitaria adquirida. Obviamente, las respuestas son diferentes si se establece contacto con una bacteria patógena que si se hace con una bacteria comensal, mutualista o probiótica (Weng y Walker, 2013).

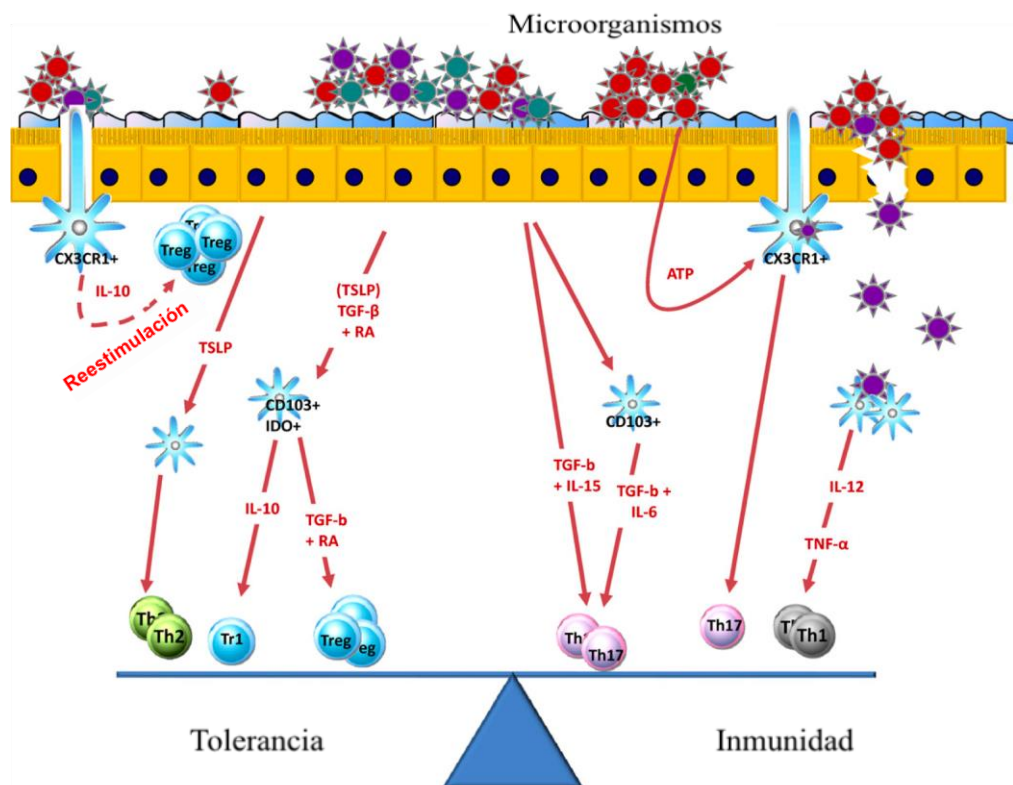


Figura 20. Acción integrada de los factores inmunitarios de la lámina propia intestinal. La microbiota del lumen determina la composición y la concentración de citoquinas, quimioquinas y otros factores en la lámina propia mediante la interacción directa con las células dendríticas (CD) y/o mediante la participación receptores de reconocimiento de patrones en las células epiteliales intestinales (CEI). Las diferentes combinaciones y concentraciones de estos factores en los tejidos influyen en las funciones específicas de las CD. En particular, determinan conjuntamente si una CD promueve la diferenciación de las células T reguladoras (Treg), Th17, Th1 o Th2. Fuente: Adaptado de Swiatczak y Rescigno, 2012.

Estas últimas bacterias también intervienen en la maduración de las células T *helper* (Th) y en su diferenciación a células Th1, Th2, Th17 y Treg, asegurando una

respuesta de base celular adecuada para el mantenimiento de la homeostasis (Swiatczak y Rescigno, 2012; Walker, 2008); (Figura 20). En condiciones fisiológicas, los fetos a término y los RN se caracterizan por una respuesta predominantemente de tipo Th2. Con la intensificación de la colonización posnatal, el sistema inmunitario equilibra esa situación al recibir un notable estímulo antigénico de tipo pro-Th1. Si por cualquier motivo (como una baja exposición a microorganismos), este cambio no se produce y prevalecen las respuestas Th2, aumentará notablemente el riesgo de padecer problemas alérgicos (Di Mauro et al., 2013).

Es importante señalar que una correcta interacción entre los microorganismos y el sistema inmunitario en las primeras etapas de la vida conduce al establecimiento de la tolerancia oral, situación caracterizada por una reducción de la respuesta inmunitaria frente a bacterias no patógenas y antígenos alimentarios mediante la activación de las células Treg (Borrueal, 2003; Walker, 2008). Es más, la correcta adquisición de la microbiota al principio de la vida posee efectos inmunitarios funcionales a corto, medio y largo plazo, por lo que se trata de un condicionante de salud en la vida futura (Renz et al., 2012; Stockinger et al., 2011; Weng y Walker, 2013; White et al., 2013). De hecho, diversos autores sugieren la existencia de un periodo crítico (o ventana de tiempo) durante los primeros días de vida en el que se debe adquirir una microbiota “saludable” para reducir el riesgo de sufrir diversas enfermedades a lo largo de la vida (El Aidy et al., 2013; Fouhy et al., 2012; Renz et al., 2012; Sim et al., 2013).

II.2.5 Microbiota intestinal e infecciones del niño prematuro

La microbiota de los niños sanos, RN a término por parto vaginal sin medicación y alimentados exclusivamente con leche de la propia madre se considera como el prototipo de la microbiota ideal para esa edad (Penders et al., 2006). Sin embargo, este estándar de colonización bacteriana óptima se puede ver alterado por el tipo de parto, la dieta, el uso de antibióticos y/o el nacimiento prematuro (Adlerberth y Wold, 2009; Fanaro et al., 2003).

Como se ha comentado en apartados anteriores de esta introducción, los niños prematuros tienen una experiencia posnatal muy distinta, en general, que la de aquellos nacidos a término. Nacen tras rotura prematura o prolongada de membranas, suelen recibir antibióticos y otros medicamentos, están inmersos en un ambiente hospitalario durante periodos relativamente prolongados, tienen retrasado el comienzo de la alimentación enteral (y, cuando se inicia, puede no ser con la leche de la propia madre), poseen una barrera gástrica alterada y, con cierta frecuencia, sus madres sufren infecciones o disbiosis microbianas en la cavidad oral, tracto gastrointestinal o en el ámbito genitourinario (Dial, 2009) (Figura 21).

Todos estos factores conducen a una alteración en el establecimiento de la microbiota intestinal, que se ha llegado a describir como aberrante. En general, estas alteraciones se caracterizan por un aumento en la prevalencia de bacterias potencialmente patógenas, una alta variabilidad entre los individuos y una menor diversidad microbiana con respecto a los RN a término (Chang et al., 2011; Jacquot et al., 2011). La microbiota de los niños prematuros suele mostrar una disminución de lactobacilos y de anaerobios estrictos, como *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, y un aumento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Barrett et al., 2013; Jacquot et

al., 2011; LaTuga et al., 2011; Penders et al., 2006). Al nivel de filo, la microbiota de estos niños está dominada por *Proteobacterias* durante su primer mes de vida (Chang et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Mshvildadze et al., 2010). La alteración en la composición de la microbiota conlleva cambios metabólicos en el hospedador y, de hecho, la concentración de AGCC es menor en las heces de los prematuros que en la de los RN a término (Arboleya et al., 2012; Favre et al., 2002; Szylit et al., 1998).

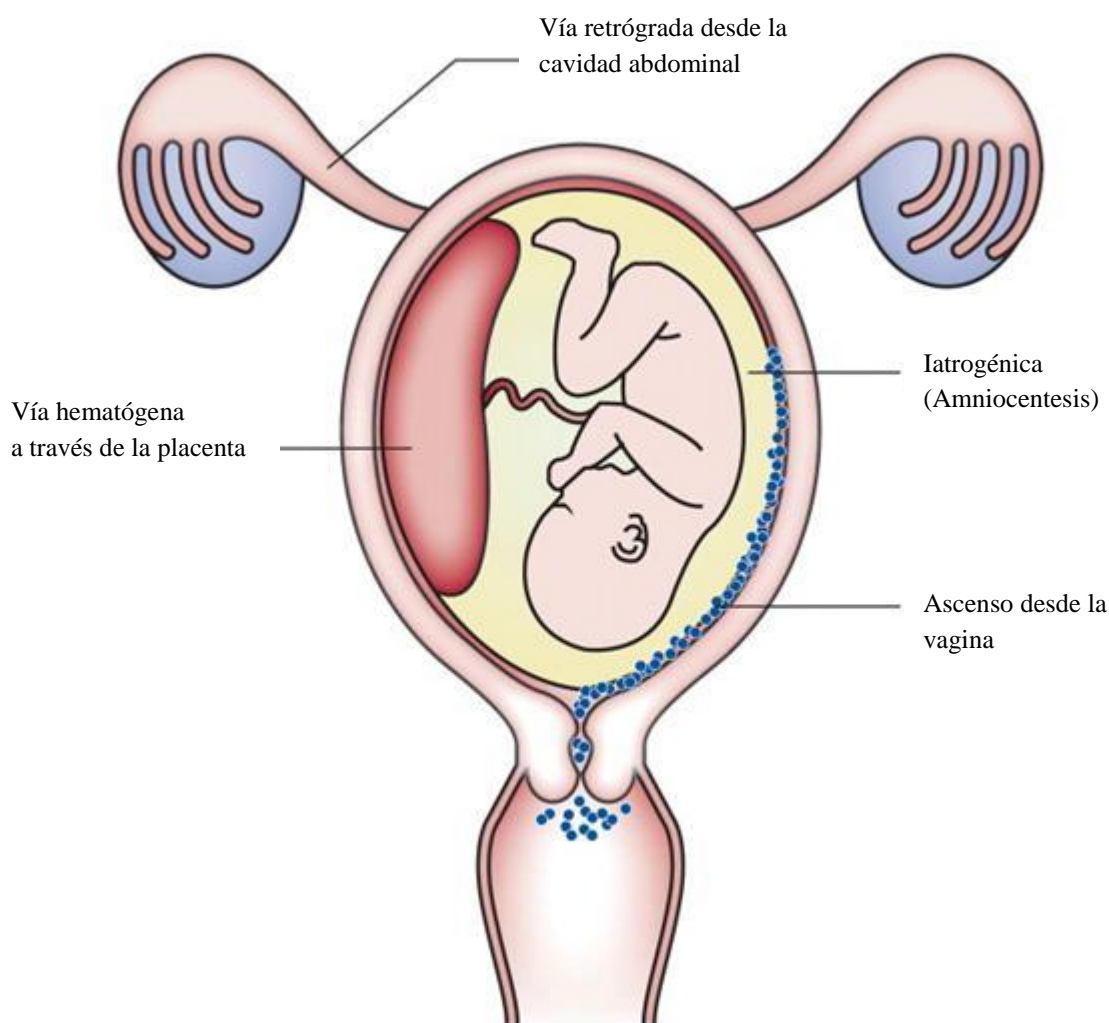


Figura 21. Posibles rutas de infección intrauterina

El hecho de nacer prematuro aumenta el riesgo de padecer infecciones neonatales (Figura 22; Tabla 11) (Lawn et al., 2010). Una sepsis neonatal es una infección, frecuentemente bacteriana, que ocurre en un RN de menos de 90 días desde su nacimiento. Las sepsis de aparición temprana se producen en la primera semana de vida mientras que las de aparición tardía ocurren entre los días 7 y 90 posparto. La incidencia de las sepsis neonatales oscila entre 0,5 y 8 de cada 1.000 nacimientos vivos y es la causa más común de mortalidad neonatal en los países en desarrollo,

representando entre el 30 - 50% del total de muertes neonatales cada año (Lawn et al., 2010).

Las sepsis neonatales de aparición temprana son menos frecuentes que las tardías pero representan una complicación muy seria del RN prematuro y pueden cursar con bacteremia, neumonía, meningitis e infecciones del tracto urinario. La tasa de mortalidad en prematuros de bajo peso con sepsis de aparición temprana es aproximadamente tres veces mayor que la de los niños de la misma EG que no padecen infección. Tradicionalmente se considera que, al menos gran parte de ellas, se originan por transmisión vertical entre la madre y el niño. Los principales agentes etiológicos son *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B) y *Escherichia coli* (Shah y Padbury, 2014; Simonsen et al., 2014). La incidencia de listeriosis neonatal es notablemente menor pero está asociada a tasas de morbilidad y mortalidad particularmente elevadas (Jiao et al., 2011). Las sepsis de aparición temprana, y especialmente aquellas que cursan con meningitis, están asociadas con una elevada incidencia de trastornos del neurodesarrollo, incluyendo parálisis cerebral, y secuelas visuales y auditivas en los niños supervivientes (Blencowe et al., 2013; Shah y Padbury, 2014; Shane y Stoll, 2014; Simonsen et al., 2014; Stoll et al., 2004).

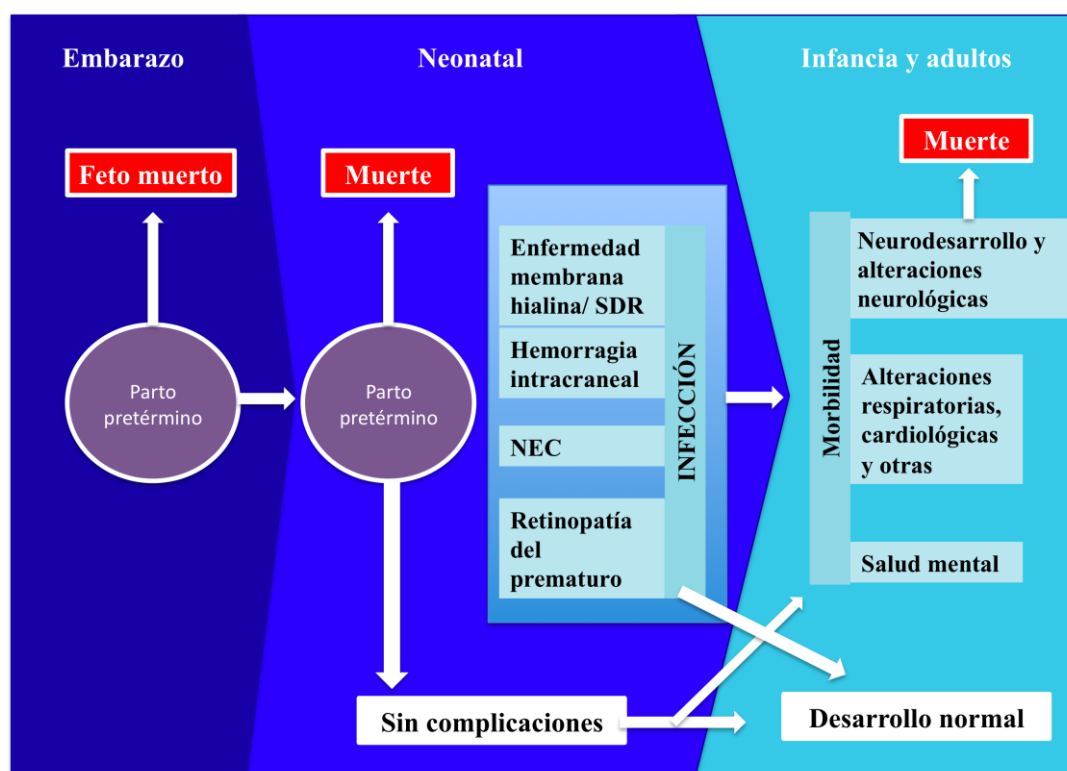


Figura 22. Papel central de las infecciones como causa de morbilidad y mortalidad en los niños prematuros. Adaptado de Blencowe et al., 2012a.

En contraste con las sepsis neonatales de aparición temprana, las de aparición tardía son más frecuentes, ocurriendo en aproximadamente un 20% de los prematuros de peso muy bajo, y suelen tener una naturaleza nosocomial. La mayoría de estas infecciones están causadas por bacterias Gram-positivas y, especialmente, por

estafilococos coagulasa-negativos (particularmente *Staphylococcus epidermidis*), que tienen capacidad para formar biopelículas y que muestran multirresistencia a antibióticos (Hell et al., 2013; Marchant et al., 2013; Polin et al., 2012). No obstante, también pueden causar infecciones nosocomiales ciertas bacterias Gram-negativas (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. y otros) y algunas levaduras de los géneros *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata*...) y *Aspergillus* (*A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* y otros) (Ali et al., 2012; Badiee et al., 2011; Peman et al., 2013; Shane y Stoll, 2014). En cualquier caso, el riesgo de infección es inversamente proporcional a la EG y al PN.

Tabla 11. Factores que predisponen al desarrollo de sepsis en el neonato.

Inmadurez del sistema inmunitario
<ul style="list-style-type: none"> - Paso transplacentario reducido de IgG materna (pretérmino) - Inmadurez relativa de todos los mecanismos inmunes (fagocitosis, actividad del complemento, función de Linfocitos T, etc.)
Exposición a microorganismos del tracto genital materno
<ul style="list-style-type: none"> - Infección amniótica por vía ascendente - Contacto con microorganismos durante el parto - Parto prematuro desencadenado por infección (corioamnionitis)
Factores periparto
<ul style="list-style-type: none"> - Traumatismos de piel, vasos, etc., durante el parto - <i>Scalp</i> de cuero cabelludo por electrodos u otros procedimientos
Procedimientos invasivos en UCI
<ul style="list-style-type: none"> - Intubación endotraqueal prolongada - Colocación de catéteres intravasculares - Alimentación intravenosa - Drenajes pleurales - <i>Shunts</i> de líquido cefalorraquídeo
Incremento de la exposición posnatal
<ul style="list-style-type: none"> - Presencia de otros neonatos colonizados - Hospitalización prolongada - Plétora hospitalaria - Escasez de personal sanitario (sobrecarga de trabajo)
Pobres defensas de superficie
<ul style="list-style-type: none"> - Piel fina, fácilmente erosionable (pretérmino)
Presión antibiótica
<ul style="list-style-type: none"> - Aparición de microorganismos resistentes - Infección fúngica

La enterocolitis necrotizante (NEC; del inglés, *necrotizing enterocolitis*), que suele afectar a niños prematuros alimentados con fórmula, entre la segunda y la tercera semana de vida, es una infección caracterizada por un daño variable en el TGI que oscila desde pequeñas lesiones en la mucosa hasta la necrosis con perforación (Chen et al., 2014). La NEC sigue constituyendo una gran preocupación para neonatólogos, gastroenterólogos y cirujanos debido a su elevada morbilidad y mortalidad, y a que, debido a su etiología multifactorial, no ha podido ser erradicada de las unidades neonatales hasta la fecha (Schnabl et al., 2008). Recientes estudios microbiómicos sugieren que este problema no se origina como consecuencia de la aparición de un agente patógeno único sino que denota la existencia de procesos de disbiosis previos al desarrollo de la NEC, caracterizados por un dominio de las poblaciones de *Firmicutes* y/o *Proteobacteria* (en este último caso, básicamente miembros de la familia *Enterobacteriaceae*) (Berrington et al., 2014; Carlisle y Morowitz, 2013; Cilieborg et al., 2012; Morrow et al., 2013; Torrazza et al., 2013). Se trata de un abordaje sin duda prometedor para la identificación de biomarcadores y el desarrollo de nuevas estrategias de prevención y tratamiento basadas en la manipulación de la microbiota intestinal.

Finalmente, conviene señalar que los microorganismos cuya prevalencia es típicamente elevada tanto en el intestino del prematuro como en el ambiente hospitalario (*Klebsiella* spp., *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus agalactiae*, estreptococos del grupo *viridans*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *Candida albicans* y otras levaduras) pueden originar consorcios polimicrobianos complejos (Mai et al., 2011; Moles et al., 2013; Normann et al., 2013; Schwiertz et al., 2003), con potencial para formar biopelículas y para intercambiar genes que confieren virulencia o resistencia a antibióticos (Beaussart et al., 2013; Logan et al., 2013; Macnow et al., 2013; Otto et al., 2013). Un mejor conocimiento de estas interrelaciones también facilitaría el desarrollo de nuevas herramientas para el control de las infecciones en las unidades neonatales.

II.3 EL GÉNERO *KLEBSIELLA*

II.3.1 *Klebsiella* e infecciones nosocomiales

El género *Klebsiella* spp. es ubicuo en la naturaleza y se pueden encontrar especies de este género en numerosas muestras ambientales y sobre las mucosas de mamíferos sanos. En los seres humanos *Klebsiella pneumoniae* puede colonizar la nasofaringe (5-38% de individuos portadores) y el tracto intestinal (1-6% de portadores) (Rosenthal y Tager, 1975; Thom, 1970).

Las klebsiellas poseen una gran importancia en todo el mundo como patógenos oportunistas en pacientes hospitalarios. De hecho, representan entre el 3 y el 8% de todas las infecciones bacterianas nosocomiales y son la segunda causa de infecciones nosocomiales por bacterias Gram-negativas después de *E. coli* (NNIS, 2000; Podschun y Ullmann, 1998). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que *Klebsiella* spp. forma parte de la microbiota normal de la leche humana pudiendo actuar como una bacteria comensal, mutualista y potencialmente probiótica para el intestino del RN (Heikkilä y Saris, 2003; Jimenez et al., 2008a; Jimenez et al., 2008b; Martin et al., 2003).

Las especies del género *Klebsiella* más implicadas en infecciones nosocomiales son *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*. Entre los factores que predisponen a sufrir una infección por ambas especies destacan los extremos de edad (neonatos, especialmente prematuros, y pacientes geriátricos), el alcoholismo crónico, la diabetes *mellitus*, las enfermedades cardíacas, renales o pulmonares crónicas y las enfermedades neoplásicas (Hansen et al., 1998). En tales circunstancias las klebsiellas se suelen asociar con infecciones de los tractos urinario y respiratorio, de heridas y de tejidos blandos, pudiendo llegar a causar septicemias mortales.

Las cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca* tienen una gran capacidad de diseminación lo que conduce a auténticos brotes nosocomiales, especialmente en unidades neonatales donde ambas especies se encuentran entre los principales patógenos oportunistas (Gupta, 2002). Durante estos brotes, los índices de mortalidad en las unidades de neonatología pueden aumentar hasta en un 70% con respecto a la tasa normal (Morgan et al., 1984). Durante las dos últimas décadas, la incidencia de infecciones nosocomiales neonatales causadas por cepas de *Klebsiella* multirresistentes a antibióticos ha aumentado (Gupta et al., 2003), estimándose que provocan aproximadamente 320.000 muertes anuales en el mundo (Zaidi et al., 2005). La mortalidad es particularmente acusada entre niños prematuros, especialmente los de bajo peso, en los que pueden causar tanto sepsis tempranas como tardías (Umeh y Berkowitz, 2013).

II.3.2 β - lactamasas de espectro extendido (BLEE) en el género *Klebsiella*

En las últimas décadas, los patrones de resistencia a antibióticos en cepas de klebsiella implicadas en infecciones nosocomiales han experimentado grandes cambios, en particular con relación a las sucesivas generaciones de antibióticos

β -lactámicos. Las cepas de *Klebsiella* son naturalmente resistentes a las aminopenicilinas (ampicilina y amoxicilina), carboxipenicilinas (carbenicilina y ticarcilina) y otras penicilinas, pero sensibles a la mayoría de los restantes antibióticos β -lactámicos. Esta resistencia natural es debida a la producción constitutiva de una β -lactamasa cromosómica de clase A, que es inhibida por el ácido clavulánico. Los genes que codifican la β -lactamasa cromosómica son conocidos como *bla_{SHV}* y *bla_{LEN}* en *K. pneumoniae* (Chaves et al., 2001) y *bla_{OXY}* en *K. oxytoca* (Fournier et al., 1996). En *K. pneumoniae*, los niveles más altos de resistencia a β -lactámicos suelen ser debidos a la producción de β -lactamasas codificadas en plásmidos (Helfand y Bonomo, 2003). Las *Klebsiella* portadoras de BLEE son de particular preocupación, ya que las infecciones están asociadas a tasas relativamente altas de mortalidad por fracaso del tratamiento (Jacoby, 1994; Lemozy et al., 1995; Peralta et al., 2012; Poirel et al., 2004; Smith Moland et al., 2003; Yan et al., 2001).

Desde 1983, el número de aislados de la dos especies citadas que muestran resistencia a la tercera generación de cefalosporinas (cefotaxima y ceftazidima) y al aztreonam ha ido creciendo paulatinamente (Paterson y Bonomo, 2005). Entre las nuevas β -lactamasas, las más comunes son las BLEEs, especialmente las pertenecientes a las familias TEM, SHV y CTX-M. Estas enzimas confieren resistencia a ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona, aztreonam y otros compuestos oximino- β -lactámicos, y son especialmente comunes en *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *E. coli* aunque también se han detectado en otras especies Gram-negativas (Jacoby y Munoz-Price, 2005).

Entre los factores de riesgo de colonización o infección por organismos productores de BLEE destacan la hospitalización durante periodos prolongados y la presencia de catéteres urinarios, tubos endorrectales, vías centrales, sondas nasogástricas (Asensio et al., 2000), gastrostomías, yeyunostomías (Schiappa et al., 1996), vías arteriales (Lucet et al., 1996), nutrición enteral total (Pena et al., 1997), cirugía reciente (De Champs et al., 1991) o malnutrición (Mangeney et al., 2000). El tiempo de hospitalización necesario para aislar bacterias productoras de BLEEs oscila entre 11 y 67 días (Asensio et al., 2000; Bisson et al., 2002; D'Agata et al., 1998; De Champs et al., 1989; De Champs et al., 1991; Lautenbach et al., 2001; Wiener et al., 1999). La administración indiscriminada de antibióticos se considera otro factor de riesgo (Pena et al., 1997). Muchos estudios han demostrado la relación existente entre las cefalosporinas de tercera generación y la aparición de aislados productores de BLEE (Ariffin et al., 2000; Asensio et al., 2000; Du et al., 2002; Eveillard et al., 2002; Ho et al., 2002; Kim et al., 2002a; Kim et al., 2002b).

Entre los nuevos fenotipos de resistencia a β -lactámicos descritos en aislados de *Klebsiella* spp. destacan dos particularmente preocupantes: la producción de enzimas que hidrolizan los carbapenems (Poirel et al., 2003; Yigit et al., 2001) y las β -lactamasas *ampC* codificadas en plásmidos, que son generalmente resistentes a los inhibidores de las β -lactamasas (Rupp y Fey, 2003). No obstante, en la actualidad los carbapenems, las quinolonas, el sulfametoxazol/trimetoprim y los aminoglicósidos suelen ser activos *in vitro* frente a la mayoría de las cepas de este género.

II.3.3 Factores de virulencia

Tradicionalmente se ha considerado que los cuatro componentes de las *klebsiellas* implicados en la patogénesis son (1) las adhesinas, (2) los polisacáridos capsulares, (3) el lipopolisacárido (LPS), y (4) los sideróforos (Podschun y Ullmann, 1998; Williams et al., 1990) (Figura 23). En los últimos años, varios estudios han tratado de identificar nuevos componentes implicados en la colonización y/o infección mediante diversas técnicas moleculares. Como resultado se han identificado una serie de genes posiblemente implicados en la patogénesis de *klebsiella* (Tabla 12) aunque en muchos casos todavía está por determinar su función en la virulencia de estas bacterias.

A. Adhesinas

La adhesión bacteriana a las células de las mucosas del hospedador representa, a menudo, el primer paso del proceso de colonización e infección. Las adhesinas se comportan frecuentemente como hemaglutininas y pueden estar localizadas en las fimbrias. Estas estructuras son proyecciones de la superficie bacteriana constituidas por una proteína globular (pilina) y median la unión de *klebsiella* a las células de las mucosas de los tractos respiratorio, gastrointestinal y genitourinario (Klemm y Schembri, 2000). Las fimbrias de tipo I (portadoras de la adhesina FimH) se encuentran en prácticamente todas las enterobacterias estudiadas, incluyendo más del 80% de los aislados clínicos de *K. pneumoniae* (Gerlach et al., 1989). Las fimbrias de tipo 3 están compuestas de una subunidad principal (MrkA) y una adhesina (MrkD). Recientemente se ha comprobado que MrkA está implicada en la formación de biopelículas (*biofilms*), una característica que parece vinculada a la persistencia y/o patogenicidad de muchas bacterias (Costerton et al., 1999). La formación de películas biológicas por bacterias patógenas puede impedir la efectividad del tratamiento con antibióticos, proteger a los patógenos de las defensas del hospedador y mejorar la comunicación bacteriana, facilitando la transmisión y expresión de genes de virulencia y de resistencia a antibióticos (Lavender et al., 2004).

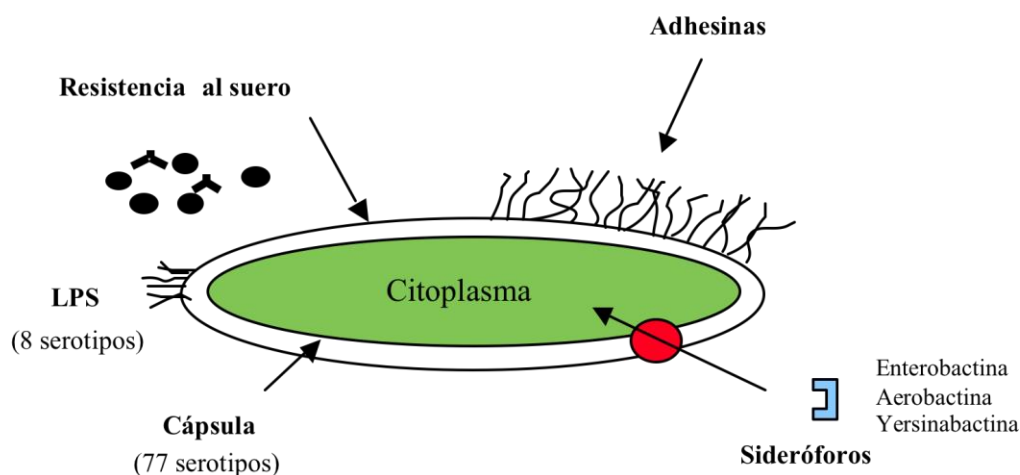


Figura 23. Esquema de los factores de virulencia en *K. pneumoniae*.

Tabla 12. Genes asociados con la virulencia del género *Klebsiella* y características asociadas a los mismos.

Gen	Características asociadas
<i>magA</i>	Mucoviscosidad. Fenotipo asociado a abscesos hepáticos
<i>rmpA</i>	Gen regulador del fenotipo mucoide. Hipermucoviscosidad
<i>wabG</i>	Biosíntesis del lipopolisacárido (LPS)
<i>uge</i>	Biosíntesis de la cápsula (CPS) y el LPS
<i>fimH</i>	Fimbria tipo I. Asociada con la adhesión
<i>kfu</i>	Sistema de adquisición de hierro
<i>iutA, iucB</i>	Biosíntesis de aerobactina (sideróforo)
<i>fepA, fepC</i>	Biosíntesis de enterobactina (sideróforo)
<i>fyu, ybtT</i>	Biosíntesis de yersiniabactina (sideróforo)

B. Polisacáridos capsulares

El género *Klebsiella* se caracteriza por presentar una cápsula polisacarídica antigénica constituida por subunidades repetidas de 4 ó 5 azúcares unidos a ácidos murínicos que definen los distintos serotipos conocidos. Actualmente, se conocen alrededor de 90 antígenos capsulares (K) diferentes. Aunque el polisacárido capsular de *klebsiella* ha estado tradicionalmente vinculado con la virulencia de este género, es realmente su contenido en manosa el que confiere el grado de virulencia (Athamna et al., 1991). El serotipo K2 es el más frecuente entre aislados clínicos humanos pertenecientes a este género (Podschun y Ullmann, 1998).

C. Lipopolisacárido (LPS)

El lipopolisacárido (antígeno O) de *klebsiella* forma parte de sus mecanismos de defensa para contrarrestar la actividad antimicrobiana de los componentes del suero. Sin embargo, el grado de protección depende del tipo de LPS presente en cada aislado. La presencia de mutaciones en los genes *wabG* o *uge*, implicados en la síntesis del LPS, provocan la disminución o eliminación de la virulencia de *K. pneumoniae* en modelos animales (Izquierdo et al., 2003; Regue et al., 2004).

D. Sideróforos

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de especies bacterianas. Las bacterias deben ser capaces de obtener el hierro ligado a proteínas para crecer de forma exitosa en los tejidos del hospedador. Por este motivo, sintetizan agentes quelantes de hierro de bajo peso molecular, más conocidos como sideróforos, que van a competir con las citadas proteínas por el Fe^{3+} . La afinidad de los sideróforos por el hierro es 10

veces mayor que la de la transferrina o la lactoferrina (Wandersman y Delepelaire, 2004). Los sideróforos unidos al hierro son transportados al interior de la célula bacteriana a través de receptores de membrana específicos.

En las enterobacterias, los sideróforos más frecuentes son la aerobactina, la enterobactina (o enteroquelina) y la yersiniabactina. La enterobactina, un sideróforo del tipo catecolato, es sintetizado por prácticamente todos los aislados clínicos (Raymond et al., 2003). La aerobactina es un sideróforo tipo hidroxamato que es producido por una pequeña fracción de enterobacterias y que presenta una afinidad por el Fe^{3+} menor que la de la enterobactina (Brock et al., 1991). En contraste con la enterobactina, existe una relación directa entre la producción de aerobactina y la virulencia de las bacterias (de Lorenzo y Martinez, 1988). La enterobactina es sintetizada por la mayoría de las cepas de *Klebsiella* mientras que la producción de aerobactina es menos frecuente (Podschun et al., 1992). La yersiniabactina es un sideróforo de tipo fenolato, menos frecuente que los anteriores que se describió por primera vez en *Yersinia* (Bach et al., 2000). Este sideróforo se ha identificado recientemente en aislados de *K. pneumoniae* implicados en infecciones pulmonares (Lawlor et al., 2007). Finalmente, se ha descrito un nuevo sistema de captación de hierro en aislados de *K. pneumoniae* que está codificado en el operón *kfu* y cuya prevalencia parece ser mayor en cepas invasivas (Ma et al., 2005).

E. Hipermucoviscosidad

La invasividad de ciertas cepas de *Klebsiella* causantes de abscesos hepáticos parece estar relacionada con el denominado fenotipo de hipermucoviscosidad. Dicho fenotipo está asociado a los serotipos capsulares K1 y K2. Se han descrito dos genes asociados al fenotipo hipermucoviscosidad: (1) el gen asociado a mucoviscosidad (*magA*), que codifica una proteína de membrana esencial en la formación de un entramado polisacárido protector en *K. pneumoniae* invasivas (Fang et al., 2004) y (2) el gen regulador del fenotipo mucoide (*rmpA*), un regulador de la síntesis de polisacárido extracelular (Nassif et al., 1989a; Nassif et al., 1989b). El gen *magA* está presente en el agrupamiento génico CPS (implicado en la biosíntesis del polisacárido capsular) responsable del serotipo K1 de *K. pneumoniae* (Chuang et al., 2006), mientras que el gen *rmpA* puede estar asociado a los serotipos K1 y K2. Se ha observado que la presencia simultánea del serotipo K1 o K2 y los genes *magA* y *rmpA* es responsable de la virulencia de los aislados de *K. pneumoniae* con fenotipo hipermucoviscosidad causantes de abscesos hepáticos (Yeh et al., 2006).

III. COLONIZACIÓN INTESTINAL EN LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS: EFECTO DE LAS SONDAS DE ALIMENTACIÓN ENTERAL



III. EARLY GUT COLONIZATION OF PRETERM INFANTS: EFFECT OF ENTERAL FEEDING TUBES

Manuscrito enviado a *BMC Microbiology*

III.1 ABSTRACT

OBJECTIVE. The objective of this work was to evaluate the potential role of the enteral feeding systems as a site for colonization by nosocomial bacteria and its impact on early gut colonization of preterm neonates.

METHODS. Twenty-six preterm neonates participated in the study. Own mother milk, donor milk and preterm formula samples were obtained after passing through the external part of the enteral tubes used to feed the neonates. Meconium and fecal samples were collected at different times until discharge and cultured. Isolates were identified by 16S rRNA PCR sequencing and MALDI-TOF. Scanning electron microscopy (SEM) was used to observe biofilm formation inside different portions of the enteral feeding systems.

RESULTS. Approximately 4,000 isolates were identified at the species level. The dominant species in both preterm feces and milk samples were *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. All of them were present at high concentrations independently of the feeding option. Subsequently, SEM revealed the presence of a dense bacterial biofilm, composed basically of the bacterial species cited above, in several parts of the feeding tubes and the tube connectors.

CONCLUSIONS. The results of this study suggest that there may be a direct relationship between the hospital-associated bacterial species that integrated the thick biofilms formed in the feeding tubes and their presence, at high concentrations, in feces of the preterm neonates.

III.2 INTRODUCTION

The colonization of the infant gastrointestinal tract (GIT) is an essential process that has important short- and long-term consequences for human health (Blaut & Clavel, 2007). Many factors affect the acquisition, composition and evolution of the infant gut microbiota, including gestational age, mode of delivery, diet or medical treatments (Murgas Torrazza & Neu, 2011). Preterm infants are frequently associated to an abnormal intestinal colonization pattern during the first weeks of life (Mshvildadze et al., 2010; LaTuga et al., 2011), a fact that increases susceptibility to disease (Claud & Walker, 2001; de et al., 2004; Madan et al., 2012). Globally, the intestinal microbiota of preterm infants exhibits a significantly reduced bacterial diversity and an abundance of microorganisms usually related to hospital environments (Schwiertz et al., 2003; Rouge et al., 2010; Jacquot et al., 2011).

As stated above, diet plays an important role in gut colonization during early life. Breastfeeding is the natural and best advisable way of supporting the growth and development of healthy term infants (Agostoni et al., 2009; American Academy of Pediatrics, 2012). In addition, current research confirms that breast milk, with appropriate fortification, is the optimal care for preterms, independently of the weight or gestational age (Schanler, 2007; Wight et al., 2008; Tudehope, 2013). When breastfeeding may not be possible and own mother's milk (OMM) may not be available, donor human milk (DM) becomes the next alternative (American Academy of Pediatrics, 2012; Arslanoglu et al., 2013). However, in practice, preterm neonates frequently receive a mixed diet regime, including alternating and variable amounts of OMM, DM and/or preterm infant formula, depending on their health status, internal hospital management and availability or not of human milk during their stay at the neonatal intensive care unit (NICU).

Preterm infants are routinely tube-fed until they are physiologically ready for coordination of sucking, swallowing and breathing, which often occurs at 33-36 weeks of postmenstrual age (Nye, 2008). Therefore, any type of feed must be applied through the same feeding device as long as it is placed in a given neonate. The inner portion of nasogastric enteral feeding tubes (NEFTs) has been shown to be important loci for colonization by NICU-associated microorganisms (Costerton et al., 1978; Bussy et al., 1992; Costerton et al., 1999; Hurrell et al., 2009). As a consequence, the pass of any nutritional source through the tubes may sweep along bacteria and have a strong impact on the infant intestinal colonization.

In this context, the objective of this work was to evaluate if the external feeding tube (EFT), which is communicated with the NEFT through a connector device, may also act as a loci for growth of nosocomial bacteria and, then, its impact on early gut colonization of preterm neonates.

III.3 METHODS

III.3.1 Subjects and sampling

Twenty-six preterm infants were recruited among those born at the Hospital Universitario 12 de Octubre of Madrid (Spain) from October 2009 to June 2010 (Table 1). The protocol of the study was approved by the Ethics Committee at Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain) and written informed parental consent was obtained for each preterm before inclusion. To be eligible for enrolment, preterms had to be born at a gestational age of ≤ 32 weeks and/or with birth weight of $\leq 1,200$ g. Neonates with any malformation or suffering from any genetic metabolic disorder were excluded from the study. Relevant clinical data, such as length of antibiotherapy, parenteral nutrition, nasogastric feeding, mechanical ventilation, hospital stay and type of feeding, are described in Table 1. All infants were fed with human milk (OMM and/or DM) and, occasionally, with preterm formula; however, there was a high individual variability in the specific feeding pattern (Table S1).

Continuous nasogastric feeding was ordinarily administrated with a pump. The syringe barrels were used as reservoirs that were connected through an EFT to the infant's NEFT (Fig. 1). The 135 feeds (OMM: 85; DM: 35, infant formula: 15) samples analyzed in this study were the last fraction obtained after their circulation through the external feeding tube, immediately before entering the nasogastric tube at the connector level (Fig. 1). Feeding tubes were routinely replaced every 24 h, which means that different feed types could pass through the same tube during such a period.

First spontaneously evacuated meconium and fecal samples were collected by the medical staff of the Department of Neonatology of the Hospital. Fecal samples were collected weekly from the diapers of the infants during their stay at the NICU. All the samples were stored at -20°C until analysis. A non-used diaper was placed inside one of the incubators to be used as a control.

III.3.2 Culture analysis of the samples and bacterial identification

Adequate dilutions of human milk, infant formula, meconium and stool samples were spread onto Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) and MRS supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) (MRScys) for isolation of lactic acid bacteria, MacConkey (MCK; BioMerieux, Marcy l'Etoile, France) for isolation of Enterobacteriaceae, Baird Parker (BP, BioMerieux) for isolation of staphylococci, Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMerieux) for isolation of yeasts, and Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid), Wilkins-Chalgren (WC, Oxoid) and Columbia Nadilixic Acid Agar (CNA, BioMerieux) as general media for isolation of other bacterial groups. Plates were aerobically incubated at 37°C for up to 48 h, with the exception of SDC plates, which were incubated at 32°C for 96 h, and WC and MRScys plates that were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at 37°C for 48 h.

Bacterial counts were recorded as the colony forming units (CFU)/ml or g and transformed to \log_{10} values before statistical analysis. At least one representative of each colony morphology type was isolated from each plate and genotyped and identified as previously described (Moles et al., 2013).

III.3.3 Scanning electron microscopy (SEM) analysis

Bacteria on the internal surface of the 6 NEFTs, connectors and EFTs (Fig. 1), selected taken into account different conditions that could be involved in microbial growth, such as temperature (cot or incubator), last feed passed through the tube, time that the tube was placed into the neonate or infusion rate (gavage or pump), were analyzed by SEM. For this purpose, they were fixed in 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in PBS pH 7.2 for 4 h at 4°C and, then, washed with cold PBS every 20 min for, at least, 4 times. The tubes were cut into 1 cm long pieces and dissected to expose the internal surface longitudinally. The tube pieces were stained with 1% (w/v) osmium tetroxide (EM grade) solution for 90 min at room temperature. This was followed by washing with deionized water and a complete dehydration of the samples in a series of increasing ethanol concentrations (50 to 100%). Subsequently, the samples were dried without introducing surface tension artifacts by using a critical point drier. The air-dried biopsies were then mounted on aluminum stubs, sputter-coated with a very thin film of gold and examined using a scanning electron microscope (JEOL 6400 JSM).

III.3.4 Statistical analysis

Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The bacterial richness and diversity of the collected samples were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Chi-square statistics, including the Fisher's exact test and the Freeman-Halton extension of the Fisher exact probability test for 2×4 contingency tables, were used to compare proportions. Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired samples *t*-tests were applied to determine differences between the bacterial counts of each identified microbial group across time. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

III.4 RESULTS

III.4.1 Characteristics of the infants

The 26 infants enrolled in this study had a mean gestational age of 28 weeks (ranging from 24 to 32 weeks), a mean birth weight of 1,288 g (ranging from 600 to 2,190 g) (Table 1). More than a half of the infants (n=14) were born by Cesarean section, all of them, except two, received antibacterial prophylaxis at least for the first 3 days of life, and 16 of them needed mechanical ventilation (Table 1). Infants were fed either with their OMM, DM and/or formula by NEFT for, at least, 17 days after delivery. The time required for spontaneous delivery of the first meconium oscillated between the first minutes to day 6 after birth. The main characteristics of the infants are presented in Table 1.

III.4.2 Microbiological characterization of own mother's milk, donor human milk and preterm formula after their pass through enteral feeding tubes

Samples (n=135) of either OMM (n=85), DM (n=35) or infant formula (n=15) were taken after their passage through the EFTs (Fig. 1), and their microbiological composition was assessed using culture-based methods. Globally, the same bacterial profile could be observed in the three different feed types (Table 2). *Staphylococcus* was the genus most frequently isolated from OMM samples (93%) in contrast with DM and formula ones where this it was present in 37% and 11% of them, respectively. *Enterococcus* was the Gram-positive genus most frequently found in DM and formula samples (49% and 27%, respectively) but it could be also isolated from a high percentage (61%) of the OMM samples. Some Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp., were also isolated from the three feed types, too (Table 2). In contrast, bifidobacteria could only be detected in two OMM samples. Mean bacterial counts of *Enterococcus* ($P=0.004$), *Staphylococcus* ($P<0.001$) and *Serratia* ($P=0.05$) were significantly higher in OMM samples (5.03, 4.82 and 5.58 log₁₀ CFU/ml, respectively) than in the other two feed types (Table 2).

At the species level, *Staphylococcus epidermidis* was the dominant species in OMM samples while *Enterococcus faecalis* was the most abundant in those of DM and infant formula. *Serratia marcescens* accounted for more than 23% of the total bacteria isolated from infant formula samples. Three *Lactobacillus* species (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*) and two *Bifidobacterium* ones (*Bifidobacterium longum* and *Bifidobacterium breve*) were detected in this study. Among them, *L. salivarius*, *B. longum* and *B. breve* were only detected in OMM samples (Fig. 2).

The diversity and evenness of the microbial communities of the different feed samples after their pass through the external portion of the tubes were determined using the Shannon diversity index. The results obtained showed that the diversity

present in OMM (1.15 ± 0.09) samples was higher than that observed in those of DM and infant formula (0.59 ± 0.11 and 0.41 ± 0.06 , respectively) (Fig. 2).

III.4.3 SEM analysis of the nasogastric enteral feeding tubes

The selected parts of six EFTs with their respective connectors and NEFTs were analyzed by SEM. The time that the tubes were placed into a preterm was the factor that exerted the highest influence on bacterial growth. Thick bacterial biofilms were observed inside the EFTs and connectors that were used for 24 h (Fig. 3 D-F) and they seemed to be particularly complex in NEFTs that were used for more than 48 h (Fig. 3 G-J). In contrast, only milk residues (but no bacteria could be observed in the inner surfaces of those NEFTs that were placed for less than 12 h (Figs. 3K and 3L).

III.4.4 Culture analysis of the meconium and fecal samples

A total of 17 meconium and 128 fecal samples were collected during the hospital stay of the infants that participated in the study; on average, 6.4 samples per infant were analyzed. Globally, inoculation of suitable dilutions of all the samples led to bacterial growth on the culture media tested, with the exception of five meconium samples. The dominant classes in all the samples analyzed were *Bacilli* and *Gammaproteobacteria* while *Bacteroidetes* and *Negativicutes* could be detected in mixed-fed infants samples from birth or after their sixth week of life, respectively (Fig. S1).

Meconium samples were characterized by an almost complete absence of Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp. ($P < 0.001$), a higher frequency of *Streptococcus* spp. ($P = 0.02$) and a lower one of *Staphylococcus* spp. ($P < 0.001$) when compared with the fecal samples (Table 3).

Mean bacterial counts obtained when meconium samples were cultured in general media, such as BHI and WC, oscillated between 3.65 and 9.85 \log_{10} CFU/g whereas in feces samples ranged from 5 to 10.17 \log_{10} CFU/g. Mean counts of all bacterial groups were higher in feces than in meconium samples but, at the genus level, the differences were statistically significant only for *Streptococcus* ($P = 0.03$) (Table 3).

In relation to the evolution of the different microbial groups in the fecal samples throughout the hospital stay, the detection frequency of the genus *Enterococcus* remained high in all the samples while that of *Staphylococcus* or *Lactobacillus* decreased after the first and second months of life, respectively (Table 4). Although the number of tested samples decreased as the number of months increased, the detection frequency of *Klebsiella* was significantly lower ($P = 0.003$) after the third month of life (Table 4).

The number of species detected in the meconium and fecal samples ranged from 5 to 20, including up to 5 classes and 12 genera (Fig. S1). Despite the inter-individual variability observed in the composition of the cultivable fecal microbiota of the infants, *E. faecalis* and *S. epidermidis* showed the highest isolation, being present in 100 and 96% of the samples, respectively (Fig. S1). Other abundant species belonging to the Class *Bacilli* were *E. faecium* (77%), *L. fermentum* (42%) and *S. aureus* (38%).

Additionally, *L. gasseri* and *L. salivarius* were isolated from 8% of the samples. With respect to the Class *Gammaproteobacteria*, the predominant species were *Klebsiella pneumoniae* (88%), *E. coli* (81%), *S. marcescens* (81%), *Enterobacter cancerogenus* (46%), *Klebsiella oxytoca* (35%) and *Escherichia fergusonii* (31%) (Fig. S1).

Finally, six different genera of the phylum *Actinobacteria* (*Rothia*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Dermabacter*, *Corynebacterium* and *Bifidobacterium*) were detected. Two species of bifidobacteria, *B. breve* and *B. longum*, could be isolated from a total of 4 infants (Fig. S1).

The diversity of the microbial communities, as assessed using the Shannon-Weaver index, was lower in meconium samples (0.42) than in the fecal ones (1.19-1.35) while the highest microbial diversity was reached after the third month of life (1.35) (Fig. 4).

Potential associations between demographic and clinical parameters and isolation of the different genera were assessed using the Fisher's test (Fig S2). The isolation of the genus *Serratia* seemed to be strongly influenced by demographic or clinical variables related to prematurity while the presence of *E. coli* was higher in fecal samples from infants with a lower degree of prematurity (Fig S2A).

III.5 DISCUSSION

In the present study, the succession of the bacterial species in meconium and feces of preterm infants during their stay in the NICU was assessed by culture-based methods. In addition, bacterial diversity was also studied in preterm feed (OMM, DM, preterm formula) after their pass through the external part of the feeding tubes.

Few studies have considered the role of neonatal NEFTs as a site of bacterial colonization and, as a consequence, as a source of bacteria for preterms and the influence of the feeding regime on the pattern of colonization of such devices. However, such studies have revealed the consistent presence of staphylococci (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*) and Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*...), including clones harboring antibiotic resistance genes, from the inner wall of most enteral feeding tubes analyzed so far (Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b; Hurrell et al., 2009). All these studies investigated NEFTs (the part of the enteral feeding system that is introduced into the neonate's digestive tract) while our work was focused, for the first time, on the EFTs, which are not in direct physical contact with the preterm (Fig. 1). However, the same or closely related microorganisms could be also detected in our study from OMM, DM and formula samples after their pass through the EFTs.

SEM analysis of the internal surfaces of some sets of EFTs, connectors and NEFTs revealed that complex microbial biofilms were formed when such devices were placed for, at least, more than 12 h. As previously described, NEFTs are kept at 37 °C and can be in place for more than 48 h, acting as a significant amplifying step for opportunistic pathogens arising from the host gastrointestinal tract (Hurrell et al., 2009). As biofilms age, bacteria will break off in clumps which, subsequently, will inoculate any fresh feed in the tube lumen leading to further bacterial multiplication and to the reinoculation of the preterm gut with the same hospital-related microbiota. On the other hand, NEFTs will contaminate EFTs at the connector level, becoming an additional source and reservoir of the own host's gastrointestinal bacteria. Therefore, it is not strange that the fecal microbiota of preterm infants is usually dominated by cultivable bacteria that are prevalent in antibiotic-rich NICUs environments (Gewolb et al., 1999; Schwiertz et al., 2003; Mshvildadze et al., 2010; LaTuga et al., 2011).

In this study, the samples that, globally, showed the highest frequencies and concentrations of bacteria after their pass through the tubes were those of OMM. This is an expected finding since, in the last decade, human milk has been shown to be a natural source of bacteria to the infant gut (Fernandez et al., 2013). OMM is given either after its collection or after cold storage, which preserves bacterial diversity of this biological fluid (Marin et al., 2009). In contrast, single-use infant formula is sterilized while DM is pasteurized, a treatment that kills all vegetative bacterial cells and that only *Bacillus* spp. spores may stand (Gómez de Segura et al., 2012). Therefore, temperature and hygiene control must be exquisite when dealing with post-pasteurized donor's milk in order to avoid contaminations or spores' outgrowth.

The major difference between OMM and the other two feed types was the isolation frequency and concentration of staphylococci (mainly *S. epidermidis*), which were significantly higher among the first type of samples. Staphylococci constitute, at

least quantitatively, the first bacterial group found in the microbiome of human milk (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Ward et al., 2013). Previously, culture-based methods revealed that *S. epidermidis* is the most prevalent species both in human milk and in feces of breastfed infants while it is practically absent in those of formula fed-infants (Jimenez et al., 2008). In fact, this species can be considered as a differential trait of the fecal microbiota of breastfed infants in contrast to enterococci which, as observed in our work, are widespread in infant feces, independently of the feeding option (Jimenez et al., 2008). Studies carried 20 years ago already described that staphylococci were common in feces of breastfed infants (Lundequist et al., 1985; Sakata et al., 1985; Wharton, 1987; Balmer & Wharton, 1989). More recently, it has been shown that coagulase-negative staphylococci colonized 100% of breastfed Western infants from day 3 onwards (Adlerberth et al., 2006). Such staphylococci colonized vaginally- and cesarean section-delivered infants equally early. Interestingly, staphylococci seem to be the bacteria with the highest ability to use human milk oligosaccharides (Hunt et al., 2012).

In relation to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*, they could be isolated from a low percentage of samples and, in the case of bifidobacteria, only after the pass of OMM samples through the EFTs. Such bacteria can also be isolated or detected, albeit at a lower rate, in non-heated human milk (Martin et al., 2003; Perez et al., 2007; Gueimonde et al., 2007; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009; Albesharat et al., 2011; Soto et al., 2014) however, their prevalence may be underrated using either culture-dependent or culture-independent techniques since their isolation is often more difficult than that of other bacteria while DNA isolation methods and currently used primers often lead to the preferential amplification of DNA sequences belonging to other bacterial groups (Palmer et al., 2007; Turroni et al., 2012). Anyway, it has been observed that the concentration and complexity of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* populations are significantly higher in breastfed than in formula-fed infants (Roger et al., 2010). A recent study has revealed that detection of lactobacilli or bifidobacterial DNA in the milk samples was significantly lower in those women that had received antibiotherapy during pregnancy, delivery or lactation (Soto et al., 2014). It has been long known that antibiotics are responsible for dysbiosis processes in the human microbiota, leading to antibiotic-associated diarrhea and gastroenteritis, urogenital and oral infections. In this context, it must be taken in account that a very high proportion of women having a preterm delivery receive antibiotherapy.

E. coli, *Klebsiella* spp. and other enterobacteria, which comprises non-pathogenic as well as potentially pathogenic bacteria, can be occasionally detected in breast milk of healthy women (Perez et al., 2007; Martin et al., 2007b) and molecular studies have shown that they are among the first colonizers of the infant gut, where it can coexist with Gram-positive bacteria (Favier et al., 2002). *Chronobacter sakazakii*, which is a major concern in NICUs, was also isolated from the internal surface of NEFTs in previous studies (Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b; Hurrell et al., 2009). However, this species could not be detected in our work.

Despite differences in bacterial diversity and concentrations, a common bacterial pattern was observed in the three types of feed after their pass by the EFTs. As stated before, this may reflect the enteric contamination from the NEFTs at the connector level and, also, the remains of bacteria present in non-heated milk since different types of feed may be administered to the same neonate through the same EFT (Table S1).

Therefore, the practice of prolonged placement of either NEFTs, EFTs or connectors in neonates needs to be reconsidered.

Human milk is not sterile but it does contain a plethora of other biologically active compounds, including antibacterial agents, such as maternal antibodies, lactoferrin, and lysozyme. This fact may explain why, although it may account for higher concentrations of bacteria in the EFT, it is also associated with lower numbers of *Enterobacteriaceae* in the inner portions of NEFTs in comparison with other feeding regimes (Hurrell et al., 2009). This effect can contribute to the health beneficial effects that are associated to the use of breast milk for preterm at NICUs settings.

Preterm neonates are usually characterized by an abnormal pattern of gut colonization in comparison to that of healthy term ones (Magne et al., 2006; Palmer et al., 2007; Butel et al., 2007; Koenig et al., 2011). This fact is important for infant's health since such a pattern is considered as a risk factor for the development of gastrointestinal infections and necrotizing enterocolitis (Siggers et al., 2011). Analysis of the meconium and fecal samples led to results very similar to those obtained with a similar (although smaller) cohort of preterm infants born in the same hospital (Moles et al., 2013). Globally, the analysis of the meconium and fecal samples revealed a low species diversity and high inter-individual variability, as previously described (Magne et al., 2006; Mshvildadze et al., 2010; Jacquot et al., 2011). Bacterial diversity in meconium samples was lower than in feces. *Bacilli* and other *Firmicutes* dominated in meconium while *Proteobacteria* did it in the fecal samples. At the genus level, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* predominated in meconium samples while members of the family *Enterobacteriaceae*, such as *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp., rapidly became dominant in feces, a fact that has been repeatedly reported (Blakey et al., 1982; LaTuga et al., 2011; Moles et al., 2013). Presence of *Serratia* spp. was strongly associated with several hospital-related parameters, which confirms the results obtained by Moles et al. (2013).

Fear of sepsis and other infections often leads to an early and widespread use of broad-spectrum antibiotics at the NICUs that, in turn, increases the risk of colonization with those bacteria highly prevalent in hospital settings, including resistant bacterial strains. The high influence of the environment explains the tendency to uniformity in the bacterial communities of preterm infants during their stay at the NICU (Schwiertz et al., 2003). In fact, bacterial profiles found in the internal surface of the EFTs, the feeds after their pass through them and the fecal samples were very similar, creating a vicious circle responsible for the reduced bacterial diversity observed in preterm fecal samples. Future works should address novel strategies to minimize the impact of the NICU's environment on the early colonization of the preterm gut.

III.6 REFERENCES

- Adlerberth, I., Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., et al. (2006). Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatric Research*, 59(1), 96-101.
- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K. F., et al. (2009). Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(1), 112-125.
- Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S., & Vogel, R. F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 148-155.
- American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), e827-41.
- Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., et al. (2013). Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), 535-542.
- Balmer, S. E., & Wharton, B. A. (1989). Diet and faecal flora in the newborn: Breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood*, 64(12), 1672-1677.
- Blakey, J. L., Lubitz, L., Barnes, G. L., Bishop, R. F., Campbell, N. T., & Gillam, G. L. (1982). Development of gut colonisation in pre-term neonates. *Journal of Medical Microbiology*, 15(4), 519-529.
- Blaut, M., & Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2), 751S-5S.
- Bussy, V., Marechal, F., & Nasca, S. (1992). Microbial contamination of enteral feeding tubes occurring during nutritional treatment. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 16(6), 552-557.
- Butel, M. J., Suau, A., Campeotto, F., Magne, F., Aires, J., Ferraris, L., et al. (2007). Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: A prospective analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44(5), 577-582.
- Claud, E. C., & Walker, W. A. (2001). Hypothesis: Inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(8), 1398-1403.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.

- de, I. C., Piloquet, H., des Robert, C., Darmaun, D., Galmiche, J., & Roze, J. (2004). Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: The putative role of clostridium. *Pediatric Research*, 56(3), 366-370.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 219-226.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., et al. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 1-10.
- Gewolb, I. H., Schwalbe, R. S., Taciak, V. L., Harrison, T. S., & Panigrahi, P. (1999). Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 80(3), F167-73.
- Gómez de Segura, A., Escuder, D., Montilla, A., Bustos, G., Pallas, C., Fernandez, L., et al. (2012). Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(2), 197-203.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S., & Isolauri, E. (2007). Breast milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1), 64-66.
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schutte, U. M., Beck, D. L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One*, 6(6), e21313.
- Hunt, K. M., Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C. A., Williams, J. E., Shafii, B., et al. (2012). Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4763-4770.
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Hilton, A., Armstrong, R., et al. (2009). Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infectious Diseases*, 9, 146-2334-9-146.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., et al. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *The Journal of Pediatrics*, 158(3), 390-396.
- Jimenez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albujar, M., Garcia, N., et al. (2008). *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*, 8, 143-2180-8-143.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C., & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253-1262.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut

- microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108 Suppl 1, 4578-4585.
- LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., et al. (2011). Beyond bacteria: A study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. PloS One, 6(12), e27858.
- Lundequist, B., Nord, C. E., & Winberg, J. (1985). The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. Acta Paediatrica Scandinavica, 74(1), 45-51.
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H., et al. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition, 97(6), F456-F462.
- Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P., & Suau, A. (2006). Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. FEMS Microbiology Ecology, 57(1), 128-138.
- Marin, M. L., Arroyo, R., Jimenez, E., Gomez, A., Fernandez, L., & Rodriguez, J. M. (2009). Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition, 49(3), 343-348.
- Martin, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H., & Rodriguez, J. M. (2007a). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. Journal of Applied Microbiology, 103(6), 2638-2644.
- Martin, R., Heilig, H., Zoetendal, E. G., Jimenez, E., Fernandez, L., Smidt, H., et al. (2007b). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. Research in Microbiology, 158(1), 31-37.
- Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., Marin, M. L., Zoetendal, E. G., et al. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 75(4), 965-969.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. The Journal of Pediatrics, 143(6), 754-758.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Gilliam, C. H., Jackson, R. J., & Smith, S. D. (2002a). Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. Journal of Pediatric Surgery, 37(7), 1011-1012.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Saltzman, D. A., Wallett, T., Jackson, R. J., & Smith, S. D. (2002b). Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. Journal of Pediatric Surgery, 37(8), 1177-1182.

- Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., et al. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 8(6), e66986.
- Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N., & Mai, V. (2010). Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of Pediatrics*, 156(1), 20-25.
- Murgas Torrazza, R., & Neu, J. (2011). The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *Journal of Perinatology : Official Journal of the California Perinatal Association*, 31 Suppl 1, S29-34.
- Nye, C. (2008). Transitioning premature infants from gavage to breast. *Neonatal Network : NN*, 27(1), 7-13.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177.
- Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., et al. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3), e724-32.
- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L., & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 11), 3329-3341.
- Rouge, C., Goldenberg, O., Ferraris, L., Berger, B., Rochat, F., Legrand, A., et al. (2010). Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*, 16(4), 362-370.
- Sakata, H., Yoshioka, H., & Fujita, K. (1985). Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European Journal of Pediatrics*, 144(2), 186-190.
- Schanler, R. J. (2007). Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 625S-628S.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Lobnitz, M., Michel, P., Radke, M., & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research*, 54(3), 393-399.
- Siggers, R. H., Siggers, J., Thymann, T., Boye, M., & Sangild, P. T. (2011). Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(6), 511-521.
- Tudehope, D. I. (2013). Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *The Journal of Pediatrics*, 162 (Suppl 3), S17-S25.

- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., et al. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS One*, 7(5), e36957.
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I., & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: A functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, 13(1), 116.
- Wharton, B. A. (1987). *Nutrition and feeding of preterm infants* (Oxford: Blackwell Scientific Publications ed.)
- Wight, N., Morton, J., & Kim, J. (2008). Managing breastfeeding in the NICU. *Best Medicine: Human Milk in the NICU*, 111-135.

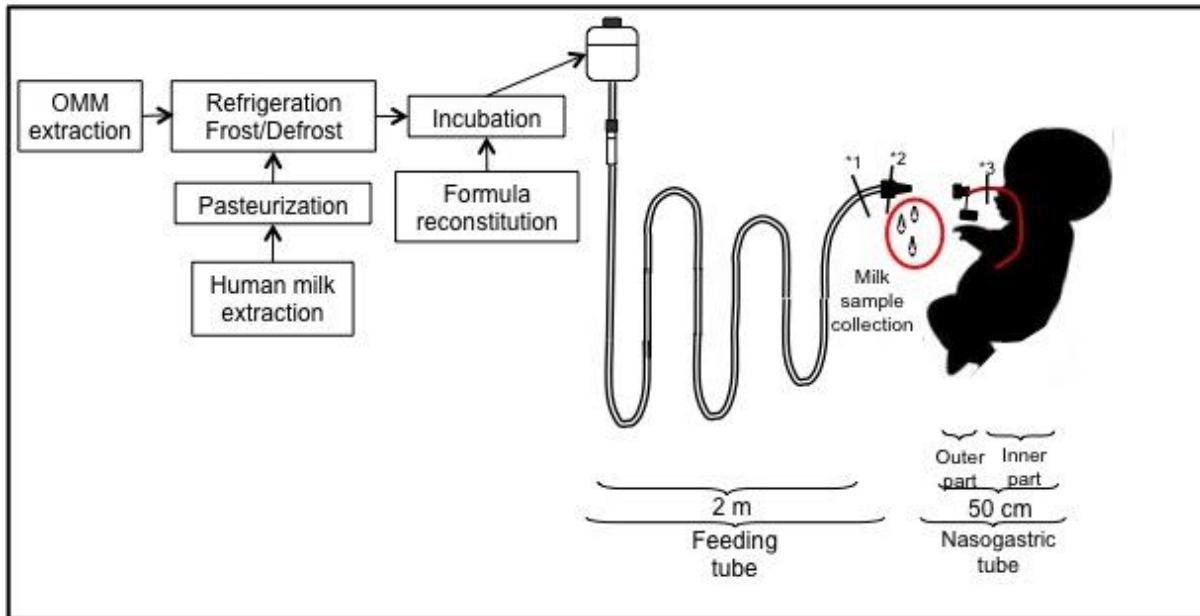


Figure 1. Diagram showing the required parts for enteral nutrition and its order from the milk extraction to the stomach of the infant. A syringe is connected to a feeding tube of approximately 2 m of length and a nasogastric tube of 50 cm. Milk sample is collected after the feeding tube and before the nasogastric tube. SEM images were taken in the points marked as *1, feeding tube, *2 connector and *3 nasogastric tube.

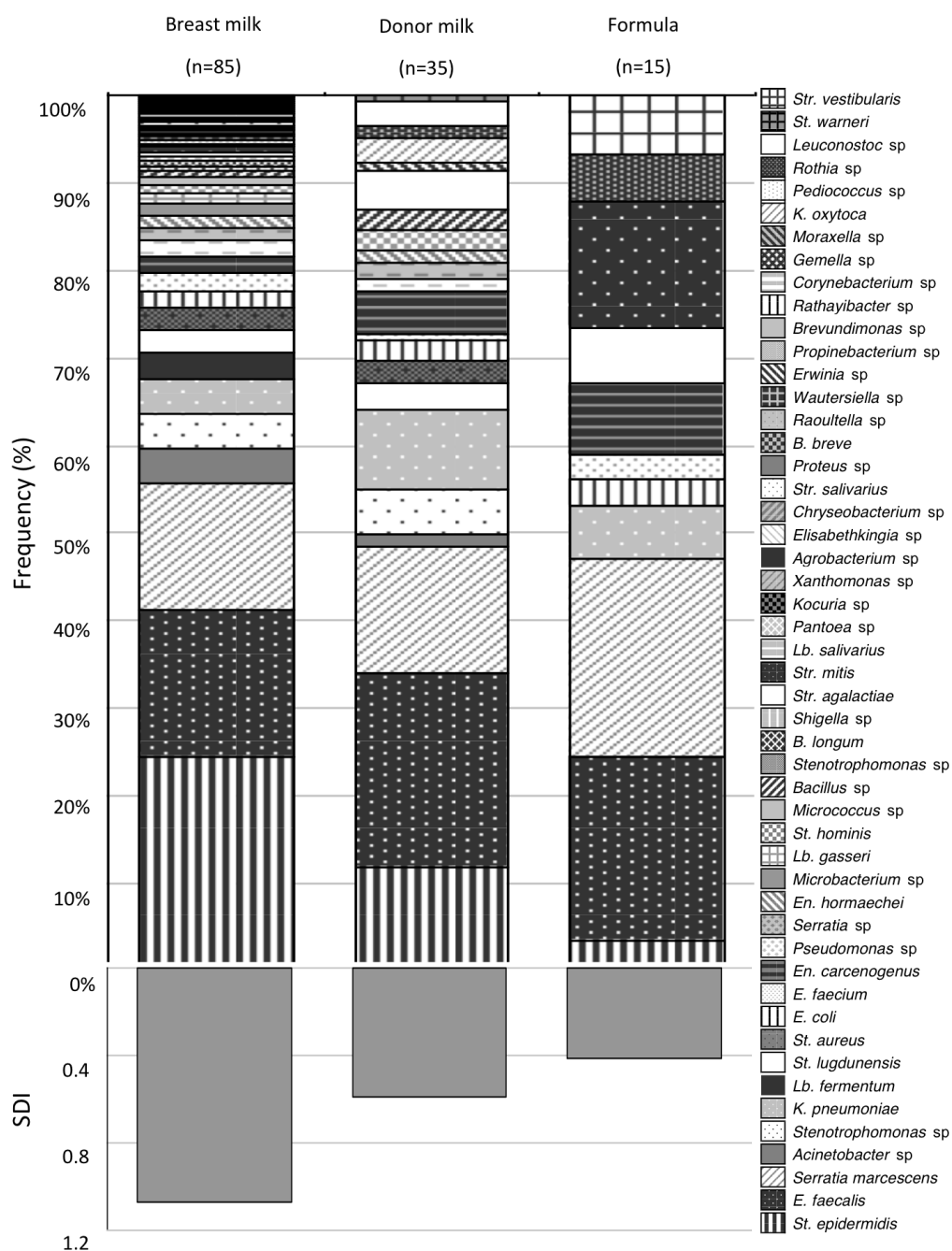


Figure 2. Frequency of bacterial species isolated from own mother milk, donor milk and infant formula. On the bottom, Shannon Diversity Index (SDI) calculated by each type of sample.

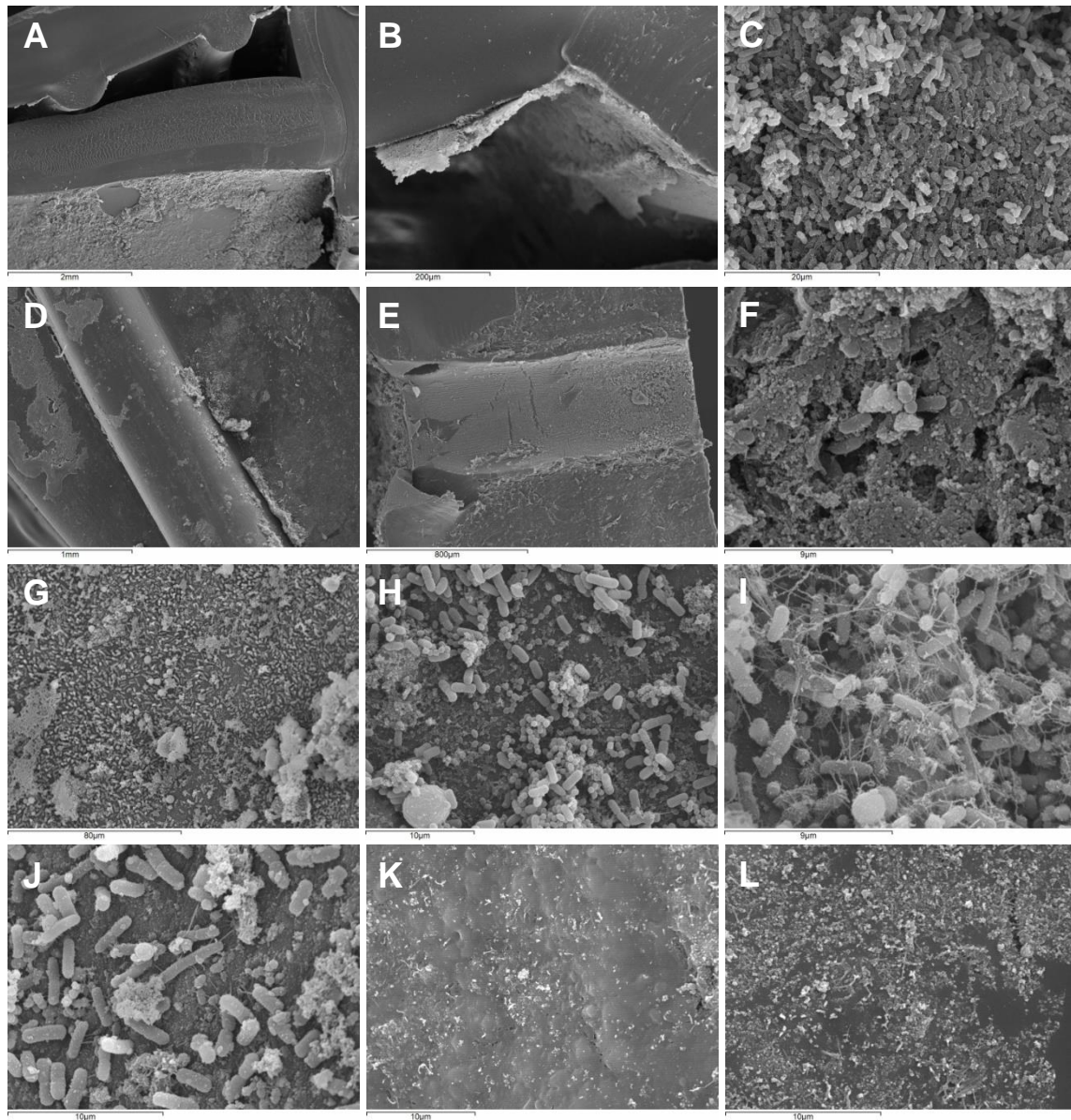


Figure 3. SEM Pictures of the inner portion in different parts of feeding tube. A, B and C showed a thick biofilm inside the FT at different magnification. Images D, E and F belong to the connector of the same FT. Images from G to L were taken of the internal part of NEFTs at different conditions. G, H, I and J were used more than 48 h while K and L were placed less than 12 hours.

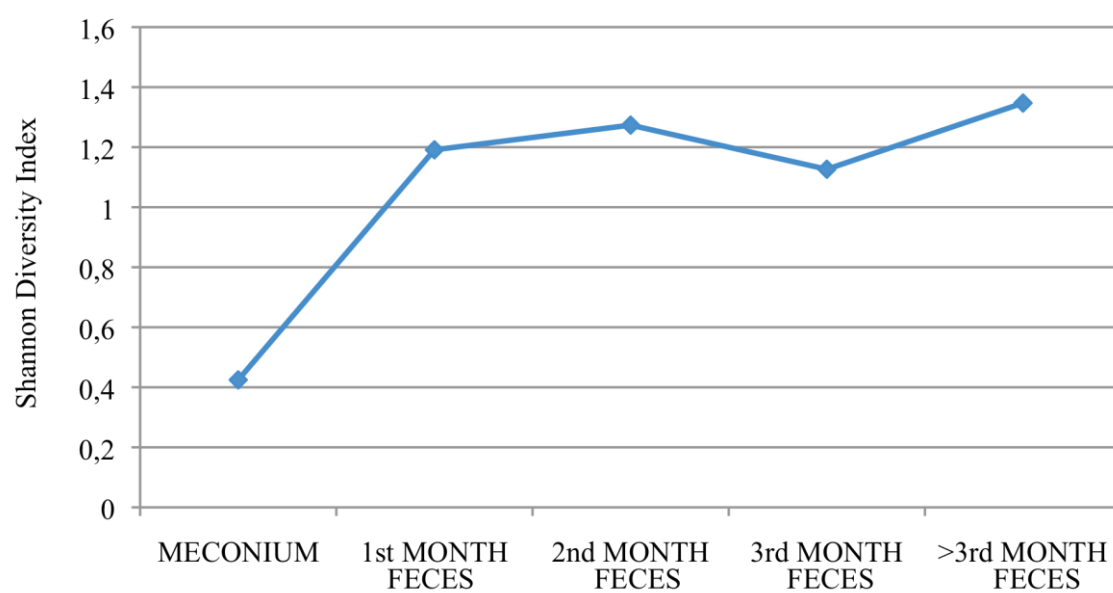


Figure 4. Shannon Diversity Index of meconium and fecal samples along the hospital stay of the infants that participated in the study.

TABLE 1. Demographic Data and Clinical Characteristics of Preterm Infants (N=26) Participating in This Study

Characteristics	Mean (95%CI) or n (%)
Gestational age (weeks)	27.7 (26.6;28.7)
Gender	
Male	13 (50%)
Female	13 (50%)
Birth weight (g)	1,167.3 (987.3;1347.3)
Z score	-0.23 (-0.50;0.04)
Delivery mode	
Vaginal section	12 (46%)
Cesarean section	14 (54%)
Antibiotherapy	
No	2 (8%)
Yes	24 (92 %)
<3 days	11 (42%)
>3 days	13 (50%)
Sepsis	7 (27%)
Parenteral nutrition, n=22 (days)	12 (5-13) ^a
Enteral feeding tube (days)	59 (46;72)
Mechanical ventilation, n=16 (days)	23 (1-36) ^a
CPAP^b, n=21 (days)	23 (12-34)
Oxygenotherapy, n=20 (days)	43.5 (1-83) ^a
NICU stay (days)	52 (18-81) ^a
Hospital stay (days)	69 (41-92) ^a
Type of feeding	
Human milk ^c	8 (30.77%)
Mixed feed from 6 th week of life ^d	10 (38.46%)
Mixed feed ^e	8 (30.77%)

^a Median (IQR).^b CPAP; Continuous positive airway pressure.^c Infants received their own mother's milk and/or donor milk during all the hospital stay.^d Infants fed with their own mother's milk and/or donor milk exclusively during the first 6 weeks of life and formula milk was introduced after then.^e Infants received their own mother's milk and/or donor milk and/or formula milk from birth.

TABLE 2. Microbiological Characterization of Isolates from Own Mother Milk (OMM), Donor (DM) and Formula Milks (FM) after their Pass Through Enteral Feeding Tubes, Used to Feed the Preterm Neonates of this Study.

Microorganism	OMM (N = 85)		DM (N = 35)		FM (N = 15)		P ^b	P ^c
	n (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	n (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	n (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)		
<i>Bifidobacterium</i>	2 (2)	5.68 (2.65-8.70) ^d	0 (0)	-	0 (0)	-	-	-
<i>Enterococcus</i>	53 (61)	5.03 (4.63; 5.43)	17 (49)	3.68 (3.00; 4.37)	4 (27)	3.88 (0.96; 6.81)	0.04	0.004
<i>Lactobacillus</i>	14 (16)	4.07 (3.54-5.30) ^d	2 (6)	6.13 (5.08-7.18) ^d	2 (13)	2.67 (1.70-3.64) ^d	0.76	0.36*
<i>Staphylococcus</i>	78 (93)	4.82 (4.30-5.30) ^d	13 (37)	2.94 (2.17; 3.71)	2 (11)	2.30 (2.00-2.60) ^d	<0.001	<0.001
<i>Streptococcus</i>	5 (6)	4.21 (3.37; 5.04)	2 (6)	5.46 (3.78-7.14) ^d	3 (20)	5.35 (3.42; 7.27)	0.15	0.30
Other G ⁺ ^e	16 (19)	3.42 (2.75; 4.09)	5 (14)	2.38 (1.60; 3.15)	1 (7)	3.93	0.47	0.20*
<i>E. coli</i>	10 (12)	3.46 (2.90; 4.02)	1 (3)	2.00	1 (7)	2.30	0.35	0.15
<i>Klebsiella</i>	20 (24)	4.27 (3.63; 4.90)	8 (23)	4.20 (2.89; 5.50)	2 (13)	5.30 (4.56-6.04) ^d	0.68	0.59
<i>Serratia</i>	45 (52)	5.58 (5.14; 6.02)	10 (29)	4.59 (3.67; 5.52)	4 (27)	4.23 (1.56; 6.89)	0.03	0.05
Other G ⁻ ^f	32 (26)	4.86 (4.36; 5.37)	5 (14)	4.90 (2.09; 7.71)	1 (7)	3.30	0.005	0.60
Yeast	5 (6)	3.59 (2.72; 4.47)	1 (3)	4.23	0 (0)	-	0.84	0.46

n, number of positive samples

^aBacterial or yeast counts (LOG CFU/mL)

^bFisher test was used to analyzed the frequency data

^cANOVA or KW(*) were used to analyzed the microbial counts data

^dMedian (IQR)

^eOther Gram-positive bacteria included the following genera: *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Corynebacterium*, *Elisabethkingia*, *Gemella*, *Kocuria*, *Leuconostoc*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Rathayibacter*, *Rothia* and *Wautersiella*.

^fOther Gram-negative bacteria included the following genera: *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Brevundimonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Moraxella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Raoultella*, *Shigella*, *Stenotrophomonas* and *Xanthomonas*.

TABLE 3. Microbial Groups Isolated from Meconium and Feces of Preterm Neonates in This Study.

Microorganism	Meconium (N = 12)		Feces (N = 128)		P ^b	P ^c
	n (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)	n (%)	Microbial Counts ^a Mean (95% CI)		
<i>Bifidobacterium</i>	0 (0)	-	6 (5)	9.45 (8.92; 9.98)	0.58	-
<i>Lactobacillus</i>	3 (19)	5.27 (2.83; 7.71)	17 (13)	7.34 (6.49; 8.19)	0.23	0.06
<i>Enterococcus</i>	7 (44)	6.48 (3.95; 9.01)	66 (52)	7.21 (6.95; 7.47)	0.65 [¥]	0.09 [#]
<i>Staphylococcus</i>	5 (20)	6.15 (3.64; 8.66)	116 (72)	8.70 (8.13; 9.15) ^d	<0.001 [¥]	0.99 [#]
<i>Streptococcus</i>	3 (19)	4.77 (0.07; 9.47)	5 (4)	8.16 (6.21; 10.11)	0.02	0.03
Other G+ ^e	2 (13)	5.20 (4.70; 5.70) ^d	11 (9)	7.11 (6.26; 7.77)	0.31	0.03
<i>E. coli</i>	0 (0)	-	67 (52)	8.98 (8.40; 9.41) ^d	<0.001	-
<i>Klebsiella</i>	1 (6)	7.27	81 (63)	8.84 (8.15; 9.30) ^d	<0.001	0.19*
<i>Serratia</i>	0 (0)	-	65 (51)	9.04 (8.46; 9.48) ^d	<0.001	-
Other G- ^f	1 (6)	6.38	35 (27)	9.22 (8.18; 9.61) ^d	0.13	0.13 [#]
Yeast	1 (6)	6.08	7 (6)	6.53 (5.27; 7.80)	0.52	0.77

n, number of positive samples

^a Bacterial and yeast counts (LOG CFU/mL)^b Fisher test or χ^2 (¥) were used to analyzed the frequency data^c ANOVA or KW([#]) were used to analyzed the microbial counts data^d Median (IQR)^e Other Gram-positive bacteria included the following genera: *Bacillus*, *Corynebacterium* (M), *Dermabacter*, *Lactococcus*, *Micrococcus* (M), *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Rathayibacter* and *Wautersiella*.^f Other Gram-negative bacteria included the following genera: *Citrobacter*, *Enterobacter* (M), *Erwinia* (M), *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Shigella*, *Stenotrophomonas* and *Veionella* (M).

(M), Meconium

TABLE 4. Mean Counts and Frequency of Microbial Groups Isolated from Feces of Preterm Neonates Through the Hospital Stay.

Microorganism	1 st month feces (N= 76)		2 nd month feces (N= 27)		3 rd month feces (N= 17)		> 3 rd month feces (N= 8)		<i>P</i> ^b	<i>P</i> ^c
	Microbial Counts ^a		Microbial Counts ^a		Microbial Counts ^a		Microbial Counts ^a			
	n (%)	Mean	n (%)	Mean	n (%)	Mean	n (%)	Mean		
		(95% CI)		(95% CI)		(95% CI)		(95% CI)		
<i>Bifidobacterium</i>	3 (4)	9.25 (8.53-9.70) ^d	1 (4)	10.00	2 (12)	9.47 (9.31-9.63) ^d	0 (0)	-	0.55	-
<i>Enterococcus</i>	67 (88)	8.52 (8.20-9.15) ^d	25 (93)	8.28 (7.82; 8.74)	17 (100)	8.75 (8.40; 9.10)	7 (88)	6.82 (6.29-7.16) ^d	0.27 [¥]	-
<i>Lactobacillus</i>	11 (14)	6.93 (5.66; 8.19)	4 (15)	8.37 (6.98; 9.75)	1 (6)	7.55	0 (0)	-	0.38	-
<i>Staphylococcus</i>	47 (62)	7.23 (6.91; 7.56)	9 (33)	7.10 (6.47; 7.73)	7 (41)	7.35 (6.19; 8.51)	3 (38)	6.82 (6.29-7.16) ^d	0.83 [¥]	<0.001
<i>Streptococcus</i>	4 (5)	7.88 (6.44-9.33) ^d	0 (0)	-	1 (6)	9.26	0 (0)	-	0.52	-
Other G+ ^e	6 (8)	7.73 (7.15; 8.31)	3 (11)	7.47 (5.70-8.74) ^d	2 (12)	5.70	1 (13)	6.7	0.12	0.70
<i>E. coli</i>	36 (47)	8.95 (8.70-9.48) ^d	15 (56)	8.72 (8.36; 9.08)	12 (71)	8.57 (7.87; 9.26)	4 (50)	8.56 (7.68; 9.44)	0.30 [¥]	0.003
<i>Klebsiella</i>	45 (59)	8.88 (8.74-9.40) ^d	18 (67)	8.57 (8.11; 9.04)	13 (76)	7.93 (7.27; 8.59)	4 (50)	7.55 (6.23; 8.87)	0.003 [¥]	0.001
<i>Serratia</i>	34 (45)	9.07 (8.70-9.59) ^d	18 (67)	8.51 (8.07; 8.96)	8 (47)	8.63 (8.07; 9.20)	5 (63)	8.80 (7.74; 9.86)	0.07 [¥]	0.002
Other G- ^f	19 (25)	8.92 (8.33-9.69) ^d	10 (37)	8.25 (7.67; 8.83)	5 (29)	8.88 (7.80; 9.96)	2 (25)	9.58 (9.24-9.92) ^d	0.06 [¥]	0.20
Yeast	5 (7)	6.33 (4.40;8.25)	0 (0)	-	1 (6)	6.40	1 (13)	7.70	0.74	-

n, number of positive samples

^aBacterial and yeast counts (LOG CFU/g)

^bFisher test or χ^2 (¥) were used to analyzed the frequency data

^cANOVA was used to analyzed the microbial counts data

^dMedian (IQR)

^eOther Gram-positive bacteria included the following genera: *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Dermabacter*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Rathayibacter* and *Wautersiella*

^fOther Gram-negative bacteria included the following genera: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Shigella*, *Stenotrophomonas* and *Veionella*

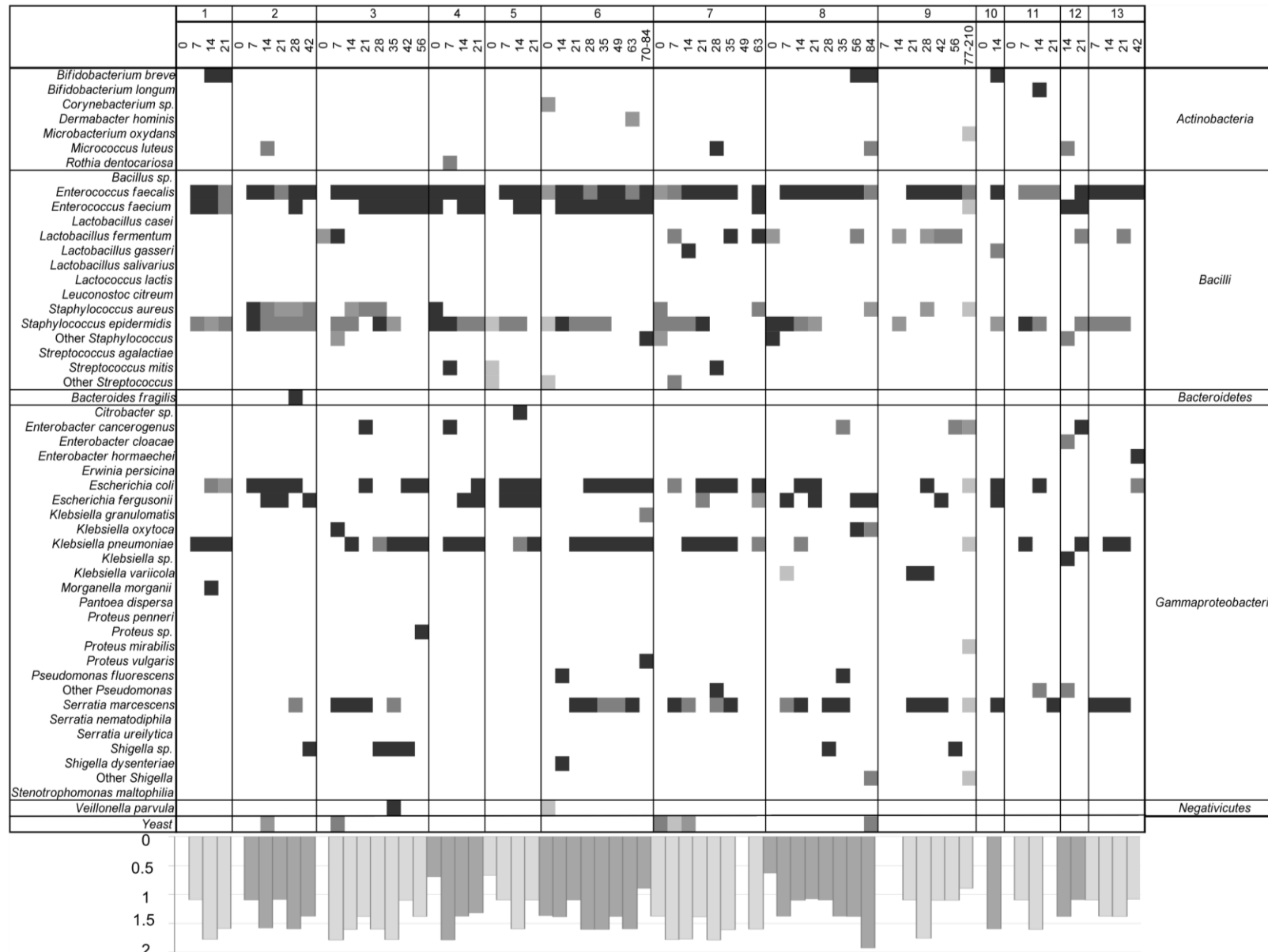
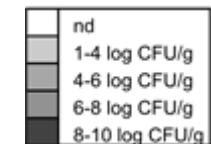


Figure S1A1. Counts of microbial species isolated and identified by species-specific PCR or 16S rRNA sequencing PCR. Twenty-seven different species were isolated and identified in some or all the samples analyzed, meconium and different weeks (days of life were represented by arabics numerals) fecal samples. Concentrations of the identified species are represented in a grey scale from non detected (nd) in white to 8 – 10 log₁₀ CFU/mL in black. On the bottom, SDI was represented by each time of the samples collection.



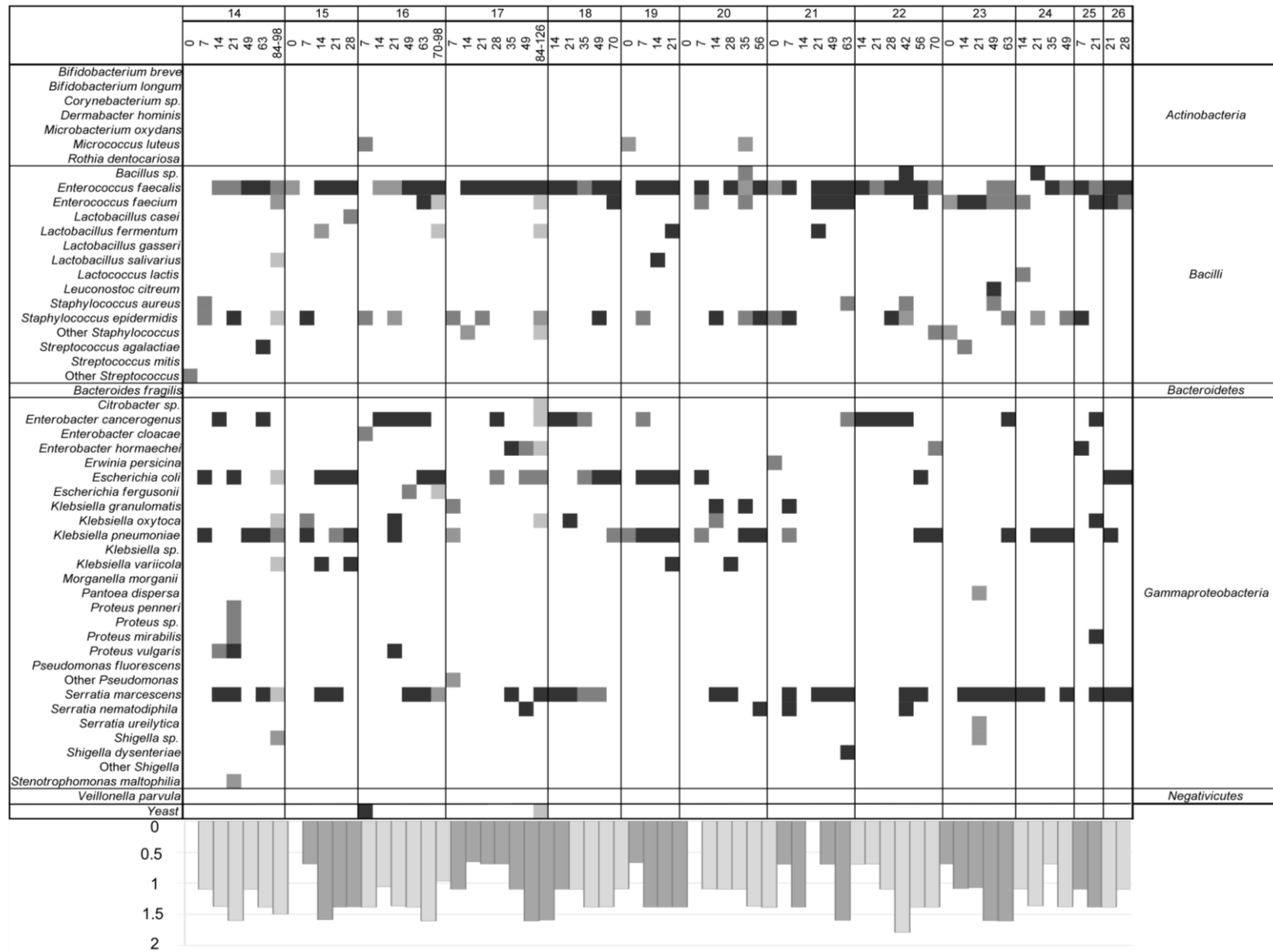
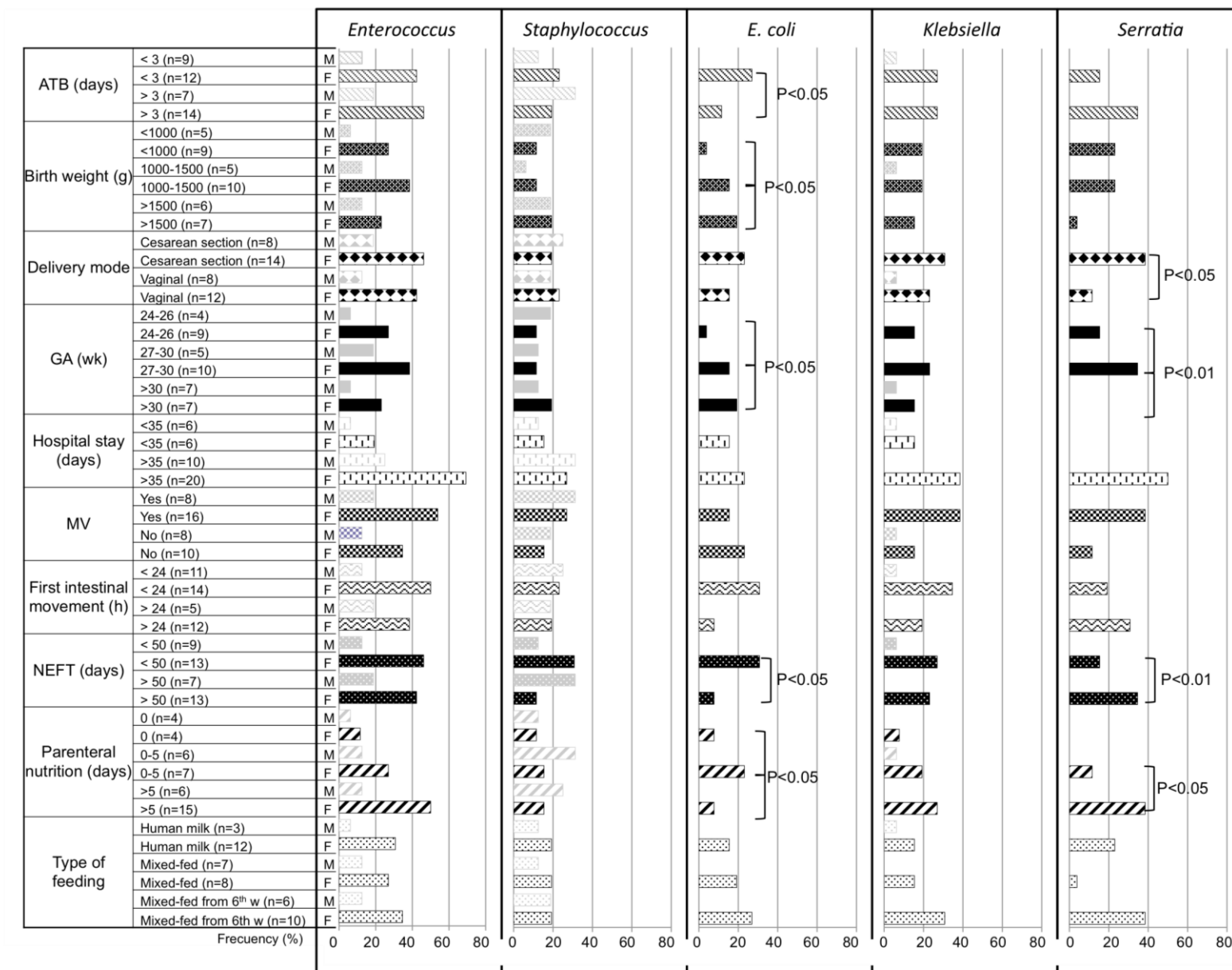
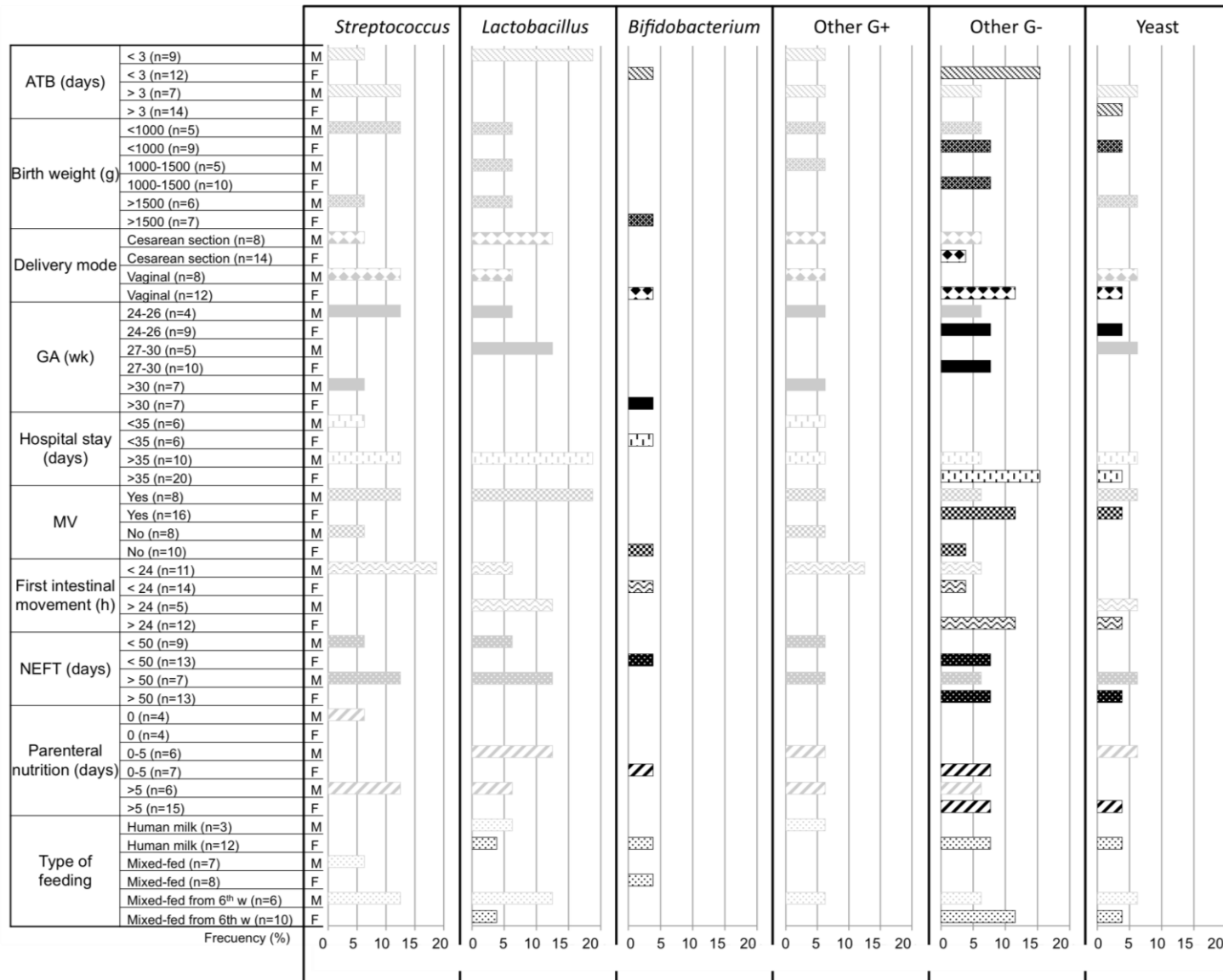


Figure S1A2. Counts of microbial species isolated and identified by species-specific PCR or 16S rRNA sequencing PCR. Twenty-seven different species were isolated and identified in some or all the samples analyzed, meconium and different weeks (days of life were represented by arabics numerals) fecal samples. Concentrations of the identified species are represented in a grey scale from non detected (nd) in white to 8 – 10 log₁₀ CFU/mL in black. On the bottom, SDI was represented by each time of the samples collection.

A





B

Figure S2 (A and B). Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

Table S1. Feeding pattern of the preterm neonates studied in this work during their first 2 months of life

Infant	1 st week				2 nd week				3 rd week				4 th week				5 th week				6 th week				7 th week				8 th week							
	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM	OMM	DM	PF	FM				
1	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+																								
2	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+B	-	+	-	+B	-	+	-	+B	-	+	-								
3	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	-	+	+				
4	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-																				
5	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-																								
6	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
7	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	-	?	-	-	-	-	+	-	-	+	-				
8	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+	-	-	-	+F	+F	-	-	+F	-	-	-				
9	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	-	+F	-	-				
10	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+B	-	-																								
11	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+BF																				
12	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+F	+F	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-												
13	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+BF	-	-	-								
14	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	-	+F	+	-				
15	+	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+F	-	-	-	-	-	-	+F	-									
16	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-				
17	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-				
18	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	+F	-	-	+F	-	+	-				
19	+	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-	-	+F	+FB	-	-	+FB	-	-	-																
20	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-				
21	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+F	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-			
22	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-				
23	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-				
24	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+F	-	-	-	+F	-	-	-	+	-	-	-				
25	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+												
26	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-				

OMM, own mother's milk; DM, Donor milk, PF, preterm formula; FM, formula milk; F, fortification; B, breast.

**IV. DIVERSIDAD BACTERIANA EN EL MECONIO DE RECIÉN
NACIDOS PREMATUROS Y EVOLUCIÓN DE LA
MICROBIOTA FECAL DURANTE EL PRIMER MES DE VIDA**



**IV. BACTERIAL DIVERSITY IN MECONIUM OF PRETERM
NEONATES AND EVOLUTION OF THEIR FECAL
MICROBIOTA DURING THE FIRST MONTH OF LIFE**

Artículo publicado en *PLoS ONE*

IV.1 ABSTRACT

The establishment and succession of bacterial communities in infants may have a profound impact in their health, but information about the composition of meconium microbiota and its evolution in hospitalized preterm infants is scarce. In this context, the objective of this work was to characterize the microbiota of meconium and fecal samples obtained during the first 3 weeks of life from 14 donors using culture and molecular techniques, including DGGE and the Human Intestinal Tract Chip (HITChip) analysis of 16S rRNA amplicons. Culture techniques offer a quantification of cultivable bacteria and allow further study of the isolate, while molecular techniques provide deeper information on bacterial diversity. Culture and HITChip results were very similar but the former showed lower sensitivity. Inter-individual differences were detected in the microbiota profiles although the meconium microbiota was peculiar and distinct from that of fecal samples. *Bacilli* and other *Firmicutes* were the main bacteria groups detected in meconium while *Proteobacteria* dominated in the fecal samples. Culture technique showed that *Staphylococcus* predominated in meconium and that *Enterococcus*, together with Gram-negative bacteria such as *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, was more abundant in fecal samples. In addition, HITChip results showed the prevalence of bacteria related to *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus mitis* in meconium samples whereas those related to *Enterococcus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Yersinia* predominated in the 3rd week feces. This study highlights that spontaneously-released meconium of preterm neonates contains a specific microbiota that differs from that of feces obtained after the first week of life. Our findings indicate that the presence of *Serratia* was strongly associated with a higher degree of immaturity and other hospital-related parameters, including antibiotherapy and mechanical ventilation.

IV.2 INTRODUCTION

The microbial colonization of the infant gastrointestinal tract is an essential process in the human lifecycle since interactions established between the microbiota and the host have important consequences for human health and disease [1]. Therefore, acquisition and diversity of the gut microbiota in term neonates have been the subject of several studies [2,3,4,5,6,7]. Different factors, such as mode of delivery, antibiotherapy, diet or environment, affect infant gut colonization [8,9] although their actual contribution to shape the infant microbiota remains unclear. In addition, gestational age and weight at birth also exert a strong influence on this process. Previous studies monitoring the bacterial communities in preterm infants indicated that the fecal microbiota of premature infants is different compared with that of term infants [10,11,12,13,14,15,16,17]. In fact, the gut colonization pattern of preterm infants has been described as delayed and aberrant [18]. Abnormal intestinal colonization during the first weeks of life may alter the barrier, nutritional and immunological functions of the host microbiota [19,20] and, as a consequence, increases susceptibility to disease [21,22]. Recently, a study on the bacterial diversity of meconium in six preterm infants showed an association between low bacterial diversity in meconium and high risk to develop sepsis [23]. In general, studies on the gut microbiota of preterm and term infants have been focused on feces; in contrast, information on the change of bacterial composition from meconium to feces during the first weeks of life is scarce, particularly in relation to preterm babies [12,14]. Traditionally, it has been considered that the intestinal tract was sterile at birth, being rapidly colonized with microorganisms from the mother and the surrounding environment. However, some studies suggest that, actually, the meconium from healthy hosts is not sterile and that gut colonization may start before birth [4,14,24,25,26,27,28]. Therefore, studies on the bacterial diversity of meconium may provide new clues on the initial gut colonizers and their potential role in infant health and disease. In a previous work of our group [27] the microbial composition of meconium samples from term healthy babies born at the Hospital Universitario 12 de Octubre was studied by culture methods. Identification of isolates from different growth media revealed that enterococci were the predominant genera followed by staphylococci, *Escherichia coli* and *Enterobacter* spp. This microbiota was substituted by obligate anaerobes, such as bifidobacteria, that became predominant during the first week of life (unpublished data). In this context, the objective of this work was to analyze bacterial diversity in meconium and feces of preterm infants during their first month of life. For this purpose culture-dependent and culture-independent methods were used since they often provide complementary views on the microbial diversity of biological samples.

IV.3 MATERIAL AND METHODS

IV.3.1 Patients and sampling

The prospective study included 14 preterm babies born at the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain) (Table 1). Written informed parental consent was obtained for each preterm before inclusion. To be eligible for enrolment, preterms must have been born at a gestational age ≤ 32 weeks and/or with birth weight $\leq 1,200$ g, and without malformations or metabolic diseases. Relevant clinical data recorded for each infant, such as length of antibiotherapy, parenteral nutrition, nasogastric feeding, mechanical ventilation, hospital stay and type of feeding, are described in Table 2. All infants were fed with human milk (donor milk and/or their own mother's milk) and, occasionally, with preterm formula.

First spontaneously evacuated meconium and fecal samples were collected by the medical staff of the Department of Neonatology of the hospital. Fecal samples were collected weekly from the diapers of the infants during their stay at the neonatal intensive care unit (NICU). All the samples were stored at -20°C until analysis. A non-used diaper was placed inside one of the incubators to be used as a control.

IV.3.2 Ethics Statement

The Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos of Madrid approved all study protocols (10/017-E). Samples and clinical information were obtained after informed, written consent by the study infants' legal guardians.

IV.3.3 Culture analysis of the samples

Adequate dilutions of meconium and stool samples were spread onto Man, Rogosa and Sharpe (MRS; Oxoid, Basingstoke, UK) and MRS supplemented with L-cysteine (0.5 g/L) (Sigma, St. Louis, USA) (MRScys) for isolation of lactic acid bacteria, MacConkey (MCK; BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for isolation of *Enterobacteriaceae*, Baird Parker (BP, BioMérieux) for isolation of staphylococci, Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMérieux) for isolation of yeasts, and Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid), Wilkins-Chalgren (WC, Oxoid) and Columbia Nadilixic Acid Agar (CNA, BioMérieux) as general media for isolation of other bacterial groups. Plates were aerobically incubated at 37°C for up to 48 h, with the exception of SDC plates, which were incubated at 32°C for 96 h, and WC and MRScys plates that were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS Don Whitley Scientific Limited, Shipley, UK) at 37°C for 48 h. Bacterial counts were recorded as the colony forming units (CFU)/g of meconium or feces and transformed to \log_{10} values before statistical analysis.

IV.3.4 Bacterial genotyping and identification

After bacterial counting, approximately 670 isolates were selected, including at least one representative of each colony morphology type. These isolates were grown in BHI or MRS broth and stored at -80°C in the presence of glycerol (30%, v/v). Isolates were analyzed by optical microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction, and tested for oxidase, catalase and coagulase activities. Subsequently, they were submitted to Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction (PCR) analysis to discard duplicate isolates from the same sample. RAPD profiles were obtained using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') [29]. Computer assisted analysis was performed with InfoQuest FP software (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Cluster analysis of RAPD pattern profiles was performed using the UPGMA method based on the Dice similarity coefficient.

Those isolates that displayed identical RAPD profile and had been obtained from the same sample were identified by species-specific PCR or 16S rRNA PCR sequencing. Initially, the isolates that, on the basis of preliminary tests, seemed to belong to the Genus *Staphylococcus* were identified as *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* or *Staphylococcus hominis* by a multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes with primers J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3'), JStAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3') and JStHom (5'-TTGACCACTACCCTCACAC-3') [30].

On the other hand, most of the isolates that seemed to belong to the Genus *Enterococcus* were identified by PCR species-specific detection of enterococcal *ddl* genes, which encode D-alanine: D-alanine ligases, following the protocol described by Dutka-Malen et al. [31]. For this purpose, four primers were used: E1 (5'-TCAAGTACAGTTAGTCTT-3'), E2 (5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'), F1 (5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3') and F2 (5'-CATCGTGTAAGCTAACTTC-3'). The first pair (E1 and E2) specifically detects *Enterococcus faecium* strains, while the second (F1 and F2) is specific for *Enterococcus faecalis*.

Identification of other bacterial species was performed by 16S rRNA PCR sequencing (ABI Prism 3730, Applied Biosystems) using primers plb16 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and mlb16 (5'-GGCTGCTGGCACGTAGTTAG-3') [32]. The resulting sequences with an average size of approximately 550 bp, were used to search sequences deposited in the EMBL database using BLAST algorithm and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>98%).

IV.3.5 DNA extraction from meconium and feces

Samples were thawed at room temperature and DNA was extracted from 0.1 g of meconium or feces, previously resuspended in 0.5 mL of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 20 mg/mL lysozyme, 5 µg/mL lysostaphin) and 0.3 mL of 3 M Na acetate. Then, mechanical lysis was performed by three times of bead-beating with 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Sigma) using a FastPrep disruptor (QBioGene, Irvine, CA, USA) at a speed setting of 6.0 m/s for 30 s. The lysate solution was treated with 0.1 mg/mL of proteinase K

(Sigma), and incubated for 30 min at 37°C. Following incubation, 0.1 mL of 1.5 M NaCl was added to the lysate and mixed. After incubation for 5 min at room temperature, the mixture was centrifuged at 16,000 ×g to pellet the insoluble cell debris. The supernatant was transferred into a new tube and extracted twice with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (25:24:1) (Sigma). The DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of isopropanol (Sigma) and incubating at -20°C for 1 h. The DNA was pelleted, washed with 70% ethanol, allowed to air dry, and finally resuspended in TE buffer. The DNA yield was measured using a NanoDrop® ND-1000 UV spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE).

IV.3.6 PCR amplification and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE)

DGGE of PCR-amplified 16S rRNA gene fragments was used to initially compare overall bacterial diversity in meconium and feces (3rd week) from 5 infants. To this purpose, primers U968-GC-f (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGG GGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') and L1401-r (5'-CGGTGTGTAC AAGACCC-3') [33,34] were used to amplify the V6 to V8 regions of the 16S rRNA gene. Then, amplicons were separated by DGGE [35] using a DCode System (Bio-Rad Laboratories). The DGGE profiles were digitally normalized by comparison with a standard pattern using InfoQuest FP software (Bio-Rad Laboratories). Cluster analysis of DGGE profiles was performed using the Neighbor Joining method based on the DICE similarity coefficient.

IV.3.7 Human Intestinal Tract Chip (HITChip) analysis

The HITChip microarray consists of over 4,800 oligonucleotide probes targeting the V1 and V6 hypervariable regions of the 16S rRNA gene from 1,132 phylotypes, spotted in duplo on custom 8×15K format arrays (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The array probes were organized based on their 16S rRNA sequences on three levels of phylogeny, as described before [36]. The HITChip signal intensity was analyzed using the following phylogenetic assignment levels: 1) the phylum-level, with the specification of *Firmicutes* down to *Clostridium* clusters and other classes, creating altogether 23 groups; 2) the genus-like level, including 131 groups of sequences with ≥90% sequence identity, and 3) the phylotype (species-like) level with 1,038 distinct phylotypes with ≥98% sequence similarity to cultured species or clones corresponding to uncultured microorganisms. Genus-level taxa with ≥90% sequence identity distributed over multiple genera are termed “*et rel.*”.

All the steps for the HITChip microarray analysis, including PCR amplification of 16S rRNA genes, RNA production and labeling, hybridization and data extraction, were performed basically as described by Rajilic-Stojanovic et al. [34]. Briefly, full-length 16S rRNA gene was amplified using primers T7prom-Bact-27-for (5'-TGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGGTTTGATCCTGGCTCAG-3') and Uni-1492-rev (5'-CGGCTACCTTGTTACGAC-3'), which ensures the introduction of a T7 promoter sequence at the 5' terminus of the rRNA gene amplicon. Then, the PCR products were purified by using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche,

Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. *In vitro* transcription of the T7 promoter-carrying 16S rRNA genes was performed using the Riboprobe System (Promega, Madison, WI, USA) while amino-allyl-modified nucleotides were coupled with CyDye using the Post-Labeling Reactive Dye (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Data were extracted from the microarray images using the Agilent Feature Extraction software, version 9.1 (<http://www.agilent.com>), subsequently normalized, and further analyzed using a set of R-based scripts (<http://r-project.org>) in combination with a custom-designed relational database that runs under the MySQL database management system (<http://www.mysql.com>; [34]). Hierarchical clustering of probe profiles was carried out using the Pearson distance and Ward's minimum variance method. Normalized hybridization signals for 23 Level 1 groups and 131 Level 2 groups are available as supplementary material in Table S1 and Table S2 respectively.

IV.3.8 Statistical analysis

Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The richness and diversity of the preterm infants' meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Fisher's exact test and the Freeman-Halton extension of the Fisher exact probability test for a 2×3 contingency tables were used to compare proportions. Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired samples *t*-tests were applied to determine differences between the bacterial counts of each identified microbial group or the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time. Principal component analysis (PCA) was applied to the dataset gathering the microbiological profile of all meconium and feces samples obtained after culture methods, to group samples according to their characteristics. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

IV.4 RESULTS

IV.4.1 Characteristics of the infants

The 14 infants enrolled in this study had a mean gestational age of 28 weeks (ranging from 24 to 32 weeks), a mean birth weight of 1,288 g (ranging from 600 to 2,190 g) (Table 1). Half of the infants (n=7) were born by Cesarean section, all of them, except one, received antibacterial prophylaxis at least for the first 3 days of life, and half of them needed mechanical ventilation (Table 2). Infants were fed either with their own mother's breast milk, donor milk and/or preterm formula by nasogastric feeding tube for, at least, 18 days after delivery. The time required for spontaneous delivery of the first meconium oscillated between the first minutes to day 5 after birth. The main characteristics of the infants are presented in Tables 1 and 2.

IV.4.2 Culture analysis of the meconium and fecal samples

A total of 14 meconium and 39 fecal samples were collected weekly during the first three weeks of life; on average, 3.8 samples per infant were analyzed (Table 1). Globally, inoculation of suitable dilutions of all the samples led to bacterial growth on the culture media tested, with the exception of three meconium samples (infants 1, 2, and 9) (Figure 1).

Identification of the isolates obtained from the different growth media revealed that the most abundant genera in all the tested samples were *Staphylococcus* and *Enterococcus*, which were detected in 77% and 64% of the samples, respectively. However, the distribution of these two genera throughout the sampling times was different (Figure 2). Staphylococci predominated in meconium and 1st week's fecal samples, being present in 50% and 100% of the samples, respectively, with *S. epidermidis* and *S. aureus* as the most abundant species. Other staphylococcal species, such as *Staphylococcus caprae*, *S. hominis* and *Staphylococcus pasteuri*, were occasionally isolated from meconium or 1st week's fecal samples (Figure 1). In contrast, *Enterococcus* was the predominant bacterial genus in the 2nd and 3rd week's fecal samples (100% and 93%, respectively) (Figure 2). *E. faecalis* and *E. faecium* could be isolated from 13 and 7 fecal samples, respectively (Figure 1).

Interestingly, *Streptococcus* species, such as *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus thermophilus*, were mainly isolated from meconium samples (Figure 1). The presence of lactobacilli and bifidobacteria was scarce among the isolates obtained on MRScys agar plates. *Lactobacillus fermentum* was isolated from 6 samples while *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium breve* and *Bifidobacterium longum* could only be isolated from the feces of one infant each (Figure 1). In contrast to streptococci, Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*, were isolated exclusively from 1st, 2nd and/or 3rd week's fecal samples (Figure 1).

Occasionally, other Gram-positive (belonging to the genera *Corynebacterium*, *Micrococcus* and *Rothia*), and Gram-negative bacteria (belonging to the genera *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Stenotrophomonas*), as well as some yeasts, were also isolated from the meconium and fecal samples analyzed in this study (Table 3, Figure 1).

Potential associations between demographic and clinical parameters and isolation of the different genera during at least two weeks in fecal samples were assessed using Fisher's tests. The isolation of the genera *Serratia* seemed to be strongly influenced by demographic or clinical variables related to prematurity. In fact, the presence of *Serratia* was significantly more frequent when the gestational age was <30 weeks ($P = 0.020$), in longer hospital stay (>35 days; $P = 0.027$) and in prolonged antibiotherapy treatment (>3 days; $P = 0.002$). Similarly, samples from infants that required mechanical ventilation showed a higher frequency of *Serratia* ($P = 0.050$). The isolation of other genera or bacterial groups was not affected by any qualitative variable (Table S3).

Total bacterial counts found when meconium samples were cultured in general media, such as BHI and WC, ranged from 3.65 to 9.85 \log_{10} CFU/g whereas in feces samples oscillated between 6.70 and 10.09 \log_{10} CFU/g. Mean *Staphylococcus* counts in fecal samples were approximately 1 \log_{10} CFU/g higher than in the meconium ones while bacterial counts of other genera, such as *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* or *Klebsiella*, were at least 2 \log CFU/g higher in feces than in meconium; however, the differences were statistically-significant only for the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Serratia* and *E. coli* (Table 3).

To visualize if differences in microbiological profiles of meconium and fecal samples analyzed in this study existed, principal component analysis (PCA) was applied to the whole dataset of bacterial counts. In the score plot containing the first and second PCs, which account for 36% of total variance, it was observed that meconium samples clustered apart from fecal samples, particularly along the PC1 dimension (Figure 3).

IV.4.3 PCR-DGGE analysis

Meconium and 3rd week's fecal samples from 5 infants were submitted to PCR-DGGE profiling. The number of major bands in individual infants ranged from 3 to 8 dominant bands. Visual comparison between the DGGE patterns revealed distinctive differences between meconium and fecal samples, being the diversity higher among the fecal ones. DGGE profiles were analyzed by the Neighbor Joining method based on the Dice similarity coefficient. Globally, the profiles clustered in two groups, one including those corresponding to the meconium samples while the second comprised those obtained from 3rd week's feces. The only exception was the meconium sample collected from infant 5 which clustered with fecal samples. DGGE analyses also revealed a high degree of inter-individual variability among the samples; in fact, similarity values were low, ranging from 50% to 75% (Figure 4).

IV.4.4 HITChip analysis

The microarray datasets of 11 meconium and 13 fecal samples collected in the 3rd week were acquired and hierarchically clustered in a heat map based on the signal intensity of the 3,699 distinct HITChip oligonucleotide probes (Figure 5). Meconium samples (with the exception of those corresponding to infants 5 and 12) and 3rd week's fecal samples clustered significantly according to the type of sample (meconium *versus* feces).

The relative contributions of the major phyla were assessed by calculating the percentages of the phylum/order taxa in the meconium and 3rd week fecal microbiota. Globally, *Firmicutes* was the most abundant phylum in meconium samples, accounting for approximately 63.4% (95% CI: 42.2%-84.6%) of the signals, followed by *Proteobacteria* (27.7%; 95% CI: 7.61%-47.7%) and *Actinobacteria* (3.5%; IQR: 0.63-10.3) (Figure 6). In contrast, *Proteobacteria* was the dominant phylum in the 3rd week's fecal samples (57.6%; 95% CI: 42.8-72.5), followed by *Firmicutes* (28.4%; CI 95%: 13.8%-43.0%) and *Actinobacteria* (12.2%; 95% CI: 2.2%-22.2%). The relative frequency of the three cited phyla differed significantly between the meconium and the fecal samples (Chi-square test; $P = 0.021$, $P = 0.052$, and $P \leq 0.001$ for *Firmicutes*, *Proteobacteria*, and *Actinobacteria*, respectively). *Bacteroidetes* represented approximately 1% (IQR: 0.1%-0.68%) of the signals in both types of samples (Figure 5 and 7).

Among *Firmicutes*, those belonging to the class *Bacilli* were the most abundant both in meconium (59.8%; 95% CI: 38.4%-81.1%) and 3rd week feces (15.4%; 95% CI: 4.5%-26.3%) samples. However, *Firmicutes* diversity was larger in the fecal samples since other groups were also detected at a relatively high percentage, including *Clostridium* cluster I (5.0%; 95% CI: 0.3%-9.7%), *Clostridium* cluster XIVa (4.9%; IQR: 0.3%-1.3%), and *Clostridium* cluster IX (2.0%; IQR: 0.0%-1.6%) (Figure 7). Fecal samples from infants 3 and 13 showed a different microbial profile with a higher abundance of *Clostridium* clusters and *Actinobacteria*, respectively (Figure 7).

On a lower taxonomic level, the comparison of the 131 hybridization signals, corresponding to the genus-like bacterial groups (level 2), obtained from meconium and fecal samples showed that 38 phylogenetic groups differed significantly between both types of samples. Among them 20 phylogenetic groups contributed for at least more than 0.5% to the microbial profile of each sample (Table 4). The presence of genus-like groups such as *Propionibacterium*, *Lactobacillus plantarum et rel.*, *Streptococcus intermedius et rel.* and *Str. mitis et rel.* decreased significantly from meconium to fecal samples. On the other hand, there was a significant increase in the abundance of groups such as *Bacteroides splanchnicus et rel.*, *Enterococcus*, *Clostridia*, *Veillonella*, *Clostridium difficile et rel.*, *E. coli et rel.*, *K. pneumoniae et rel.*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Yersinia et rel.* groups from meconium to the fecal samples (Table 4). Among the phylogenetic groups contributing $\geq 0.1\%$ to the fecal profiles, *Enterobacter aerogenes et rel.*, *Enterococcus*, *E. coli et rel.*, *Haemophilus*, *K. pneumoniae et rel.*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Vibrio* and *Yersinia et rel.* were detected in all the fecal samples, adding up to approximately 55% of the total hybridization signals in ten of them. In contrast, only two phylotype groups, *L. plantarum et rel.* and *Str. mitis et rel.*, formed a core microbiome in meconium

samples, while there was a great inter-individual variability for the rest of phylotypes (data not shown).

The detailed analysis of signal intensities of species-like taxa (level 3) showed an average of 441 phylotype-like taxa in the meconium samples and 406 of these in the fecal samples, representing 42% and 39% of the total number of the phylotype-like taxa that were above the signal threshold, respectively. The intensity of the hybridization signals obtained with the oligonucleotide probes corresponding to *L. fermentum*, *Lactobacillus reuteri*, *S. epidermidis*, *Streptococcus viridans* and uncultured *Streptococcus* sp. NB4D2 was particularly strong among the meconium samples, while phylotype probes corresponding to *Enterobacter cloacae*, *E. faecalis*, *E. coli*, *Hafnia alvei*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Serratia liquefaciens* and *Shigella dysenteriae* led to more intense hybridization intensities among the fecal ones (Table S4). Proteobacterial phylotype-like taxa were mainly detected in fecal samples and, also, in the meconium samples obtained from infants 5 and 12 (Table S5). With respect to the *Lactobacillus* and *Lactococcus* phylotype-like taxa, a total of 15 different phylotypes were detected, being the meconium obtained from of infants 1, 2, 4 and 11 the ones that showed the highest diversity (Table S6). In meconium from infant 2, *Lactobacillus* phylotype-like taxa represented 82% of the total hybridization signals while those of *L. reuteri* and *Lactobacillus vaginalis* contributed with 45% and 27% to the total hybridization signals, respectively (Table S6). Bifidobacterial phylotype-like taxa were mainly detected in one meconium (infant 5) and five fecal samples (infants 1, 4, 5, 9 and 13) (Table S7). Among the 12 bifidobacteria phylotype-like taxa detected in this study, those of *B. breve*, *Bifidobacterium catenolatum* and *Bifidobacterium infantis* were the most abundant. In the fecal sample of infant 13, 44% of the hybridization signals corresponded to bifidobacterial species while, in the rest of fecal samples where they were present, they represented between 19 and 27% of the signal intensities (Table S7). Phylotype-like taxa belonging to the *Clostridium* spp. were infrequent either in meconium or fecal samples, except in the fecal sample of infant 13 where they represented 17% of the total hybridization signal (data not shown).

IV.4.5 Comparison between the results obtained by cultures and HITChip

Globally, there was a good correlation between the principal phylum/orders detected in the samples by the culturing and molecular approach (Figure 6). In general, the class of the *Bacilli* was the predominant bacterial group among meconium samples whereas *Proteobacteria* was the main phylum observed among the fecal ones.

Considering the genus-like taxonomy level, both culture and HITChip techniques showed that *Enterococcus* was a relevant group in the meconium and/or feces of the preterm infants. Other genera, such as *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* or *Streptococcus*, could be detected by both techniques but the detection frequency was lower using the culture-based approach (Tables 3 and 4). In addition, the HITChip technique allowed the detection of other bacterial genera, such as *Lactococcus* or *Clostridium* that could not be isolated in the cultures of the respective samples.

Finally, the diversity of the microbial communities obtained by culturing or using the HITChip was also evaluated. The Shannon-Weaver indices obtained with culture techniques were lower than those obtained with the microarray, which indicated a superior sensitivity of the molecular technique (Figure 8). Anyway, both methods revealed higher bacterial diversity in fecal than in meconium samples (Paired t-test; $P = 0.016$ and $P = 0.011$, for HITChip and culture techniques, respectively). The Shannon diversity index showed a greater variability among the meconium samples (ranging from 0.00 to 1.38 with culture techniques, and from 2.09 to 4.28 with microarrays) than among the fecal ones (ranging from 1.07 to 1.60 with culture techniques, and from 3.50 to 4.43 with microarrays).

IV.5 DISCUSSION

In the present study, the succession of the bacterial species in meconium and feces of preterm infants in their first 3 weeks of life was assessed by culture-based methods, PCR-DGGE and the HITChip microarray. The combination of culture analysis and culture-independent techniques provided highly complementary views of the microbiota present in the analyzed samples. The results obtained by both approaches showed a good correlation although the HITChip method was most sensitive and led to the detection of higher bacterial diversity, probably due to the different recovery/survival after sample thawing and complex nutritional requirements of some species when using culture methods. Other differences between culture- and molecular-based methods could be related to PCR bias, cross hybridization and difficulty of detection if species are present in low levels, in agreement with previous studies [18]. In general, analysis of meconium and feces of preterm infants revealed low species diversity and high inter-individual variability, as previously described [13,14,37,38]. Bacterial diversity in meconium samples was lower than in feces although the diversity indices obtained in both types of samples upon HITChip analysis were higher than those reported in previous studies [13,14,16]. *Bacilli* and other *Firmicutes* dominated in the meconium and *Proteobacteria* did in the fecal samples. At the genus level, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Lactobacillus* predominated in meconium samples while members of the family Enterobacteriaceae, such as *Escherichia*, *Klebsiella* or *Serratia*, rapidly became dominant in feces, a fact that has been repeatedly reported [11,12,13,14,15,16,38,39]. In a previous work [27] where meconium samples from term healthy babies born at the same hospital were analyzed, *E. coli* and *Leuconostoc* sp. were detected by culture methods, as it has been described recently by Gosalbes et al [7] with molecular techniques. In contrast, in this work these species had not been isolated by culture methods although a low signal intensity of *E. coli* was detected by HITChip in meconium samples of preterm infants. It should be taken into account that freezing can introduce microbiological biases in culture methods as indicated before.

Premature birth usually results in a delayed and abnormal qualitative pattern of gut colonization, which is often described as aberrant in comparison to that of healthy term ones [5,6]. This fact seems to affect infant's health and constitutes a risk factor for the development of gastrointestinal infections, such as necrotizing enterocolitis [21,40]. In a recent study, where meconium and fecal samples from 6 preterm infants were analyzed by 16S rRNA high throughput pyrosequencing, it was found that gut colonization seemed to follow specific patterns [23]. Subjects who develop sepsis showed a *Proteobacteria* and *Firmicutes* (*Staphylococcus*) predominance. Notably, healthy subjects, who received limited antibiotics (<3 days total) and did not develop sepsis ultimately, exhibited an increase in relative abundance of anaerobes, similarly to more 'mature' microbial communities, including *Clostridium*, *Klebsiella* and *Veillonella* [23]. The fecal microbiota of preterm infants is usually dominated by cultivable bacteria that are prevalent in antibiotic-rich hospital environments, such as NICUs. In this study, presence of *Serratia* was strongly associated with several hospital-related parameters, including antibiotherapy and mechanical ventilation. Fear of infections often leads to an early and widespread use of broad-spectrum antibiotics at the NICUs, a strategy that increases the risk of colonization with resistant bacterial strains [41]. The high influence of the environment is in accordance with previous

studies that reported a tendency to uniformity in the bacterial communities of preterm infants during their stay at the NICU [16]. Likewise, it has been recently shown that the NICU was a major determinant influencing clostridia colonization of preterm infants and that antibiotic course influenced the levels of colonization [42]. A recent in depth pyrosequencing study examined the gut-associated microbiome of 11 extremely low birth weight infants in the first postnatal month. This study confirmed that Enterobacteriales, *Staphylococcus*, and *Enterococcus* were among the most abundant bacterial taxa in a low-diversity bacterial community that was dominated by types of bacteria known to cause invasive disease in these infants [12].

In preterm neonates, colonization by strict anaerobes seems particularly delayed [13]. Clostridia colonization varies greatly from baby to baby in the timing of their first appearance while *Bacteroides* and bifidobacteria have been seldom isolated from feces of these infants [38,43,44]. In this study, bifidobacteria and bifidobacterial DNA could be isolated and detected, albeit at a low frequency. A previous study showed that the birth gestational age had a significant impact on infant colonization by bifidobacteria, which always occurred in children born at a birth gestational age greater than 33 weeks [10]. In fact, some studies have evidenced the relatively low frequency and abundance of bifidobacteria in the fecal microbiota at any age from birth to adulthood [6]. These authors suggested that the emphasis on bifidobacteria in studies and reviews of the infant gastrointestinal microbiota may be out of proportion to its prevalence, abundance, and relevance to health. This aspect should be addressed in future work.

Globally, our results indicate that spontaneously-released meconium of preterm neonates harbors a specific microbiota, different to that of feces obtained after the first week of life. Previous studies have shown the presence of a similar cultivable microbiota in umbilical chord's blood and hygienically-collected meconium of term and preterm infants, suggesting that fetal gut may not be sterile before delivery and that, therefore, at least a part of the bacteria found in meconium has not a postnatal origin [14,26,27].

Probably, such bacteria could reach the fetal gut through *in utero* swallowing of amniotic fluid. Culture-dependent and -independent studies have revealed that there are bacteria in human amniotic fluid without rupture of membranes [24]. Previously, we showed that oral administration of an enterococcal strain to pregnant mice led to their presence in amniotic fluid and meconium obtained by Cesarean section [26]; this fact is not surprising since it has been reported that bacteria of the digestive tract can reach amniotic fluid through the blood stream [45]. Another study carried out in pregnant women focused on the influence of the composition of their oral microbiota in the pregnancy outcome and showed that some bacteria, such as *Actinomyces naselundii*, were associated to lower birth weight and earlier delivery, while others, such as lactobacilli, were linked with a higher birth weight and later delivery date. The results of such study suggested that oral bacteria can enter the uterine environment through the bloodstream and may influence the delivery process [46]. Streptococci and staphylococci seemed to be among the dominant bacteria in the meconium samples and, interestingly, their presence in chorioamnion samples of healthy mothers submitted to caesarean section has been described previously [47]. The potential existence of initial gut colonization during the fetal stage deserves future research

since it could have important health implications; as an example, its modulation during pregnancy could help to avoid premature deliveries.

Acknowledgments: We would like to thank all the families that participated in this study.

IV.6 REFERENCES

1. Blaut M, Clavel T (2007) Metabolic diversity of the intestinal microbiota: implications for health and disease. *J Nutr* 137 (3 Suppl 2): 751S–755S.
2. Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA (2006) Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 21: 517–523.
3. Favier CF, de Vos WM, Akkermans AD (2003) Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe* 9: 219–229.
4. Hong PY, Lee BW, Aw M, Shek LP, Yap GC, et al. (2010) Comparative analysis of fecal microbiota in infants with and without eczema. *PLoS ONE* 5: e9964.
5. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, et al. (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 Suppl 1: 4578–4585.
6. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 5: e177.
7. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, et al. (2013) Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy* 43(2):198–211.
8. Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* 91: 48–55.
9. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, et al. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 118: 511–521.
10. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, et al. (2007) Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44: 577–582.
11. Gewolb IH, Schwalbe RS, Taciak VL, Harrison TS, Panigrahi P (1999) Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 80: F167–173.
12. LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, Goldberg RN, Wynn JL, et al. (2011) Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One* 6: e27858.
13. Magne F, Abély M, Boyer F, Morville P, Pochart P, et al. (2006) Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 128–38.
14. Mshvildadze M, Neu J, Shuster J, Theriaque D, Li N, et al. (2010) Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr* 156: 20–25.

15. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K (1985) Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr* 144: 186–190.
16. Schwiertz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, et al. (2003) Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res* 54: 393–399.
17. Wang Y, Hoenig JD, Malin KJ, Qamar S, Petrof EO, et al. (2009) 16S rRNA gene-based analysis of fecal microbiota from preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *ISME J* 3: 944–954.
18. Rougé C, Goldenberg O, Ferraris L, Berger B, Rochat F, et al. (2010) Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe* 16: 362–370.
19. Hooper LV, Gordon JI (2001) Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 292: 1115–1118.
20. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI (2006). Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature* 444: 1022–1023.
21. Claud EC, Walker WA (2001) Hypothesis: inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB J* 15: 1398–1403.
22. de la Cochetiere MF, Piloquet H, des Robert C, Darmaun D, Galmiche J, et al. (2004) Early intestinal bacterial colonization and necrotizing enterocolitis in premature infants: The putative role of *Clostridium*. *Pediatr Res* 56: 366–370.
23. Madan JC, Salari RC, Saxena D, Davidson L, O'Toole GA, et al. (2012) Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 97(6):F456-462.
24. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, et al. (2008) Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS ONE* 3: e3056.
25. Hufnagel M, Liese C, Loescher C, Kunze M, Proempeler H, et al. (2007) Enterococcal colonization of infants in a neonatal intensive care unit: associated predictors, risk factors and seasonal patterns. *BMC Infect Dis* 7: 107.
26. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, et al. (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51: 270–274.
27. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, et al. (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol* 159: 187–193.
28. Satokari R, Gronroos T, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E (2009) *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Lett Appl Microbiol* 48: 8–12.
29. Ruiz-Barba JL, Maldonado A, Jiménez-Díaz R (2005) Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Anal Biochem* 347: 333–335.

30. Jimenez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, et al. (2008) *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. BMC Microbiol 8: 143.
31. Dutka-Malen S, Evers S, Courvalin P (1995) Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J Clin Microbiol 33: 24–27.
32. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR (2000) Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. J Appl Microbiol 89: 511–516.
33. Felske A, Akkermans ADL, de Vos WM (1998) Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis. Appl Environ Microbiol 64: 4581e-4587e.
34. Nubel U, García-Pichel F, Muyzer G (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. Appl Environ Microbiol 63: 3327–3332.
35. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden GA (1993) Profiling of complex populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59: 695–700.
36. Rajilić-Stojanović M, Heilig HG, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, et al. (2009) Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. Environ Microbiol 11: 1736–1751.
37. Favier CF, Vaughan EE, de Vos WM, Akkermans ADL (2002) Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Appl Environ Microbiol 68: 219–226.
38. Jacquot A, Neveu D, Aujoulat F, Mercier G, Marchandin H, et al. (2011) Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. J Pediatr 158: 390–396.
39. Blakey JL, Lubitz L, Barnes GL, Bishop RF, Campbell NT, et al. (1982) Development of gut colonisation in pre-term neonates. J Med Microbiol 15: 519–529.
40. Siggers RH, Siggers J, Thymann T, Boye M, Sangild PT (2011) Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates. J Nutr Biochem 22: 511–521.
41. de Man P, Verhoeven BA, Verbrugh HA, Vos MC, van den Anker JN (2000) An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. Lancet 355: 973–978.
42. Ferraris L, Butel MJ, Campeotto F, Vodovar M, Rozé JC, et al. (2012) Clostridia in premature neonates' gut: incidence, antibiotic susceptibility, and perinatal determinants influencing colonization. PLoS One 7:e30594.
43. Rougé C, Piloquet H, Butel MJ, Berger B, Rochat F, et al. (2009) Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Am J Clin Nutr 89: 1828–1835.

44. Campeotto F, Suau A, Kapel N, Magne F, Viallon V, et al. (2011) A fermented formula in preterm infants: clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up regulation of faecal secretory IgA. *Br J Nutr* 105: 1843–1851.
45. Kornman KS, Loesche WJ (1980) The subgingival microbial flora during pregnancy. *J Periodont Res* 15: 111–122.
46. Dasanayake AP, Li Y, Wiener H, Ruby JD, Lee MJ (2005) Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *J Periodontol* 76: 171–177.
47. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP (2002) Possible association between amniotic fluid microorganism infection and microflora in the mouth. *Br J Obstet Gynaecol* 109: 527–533.

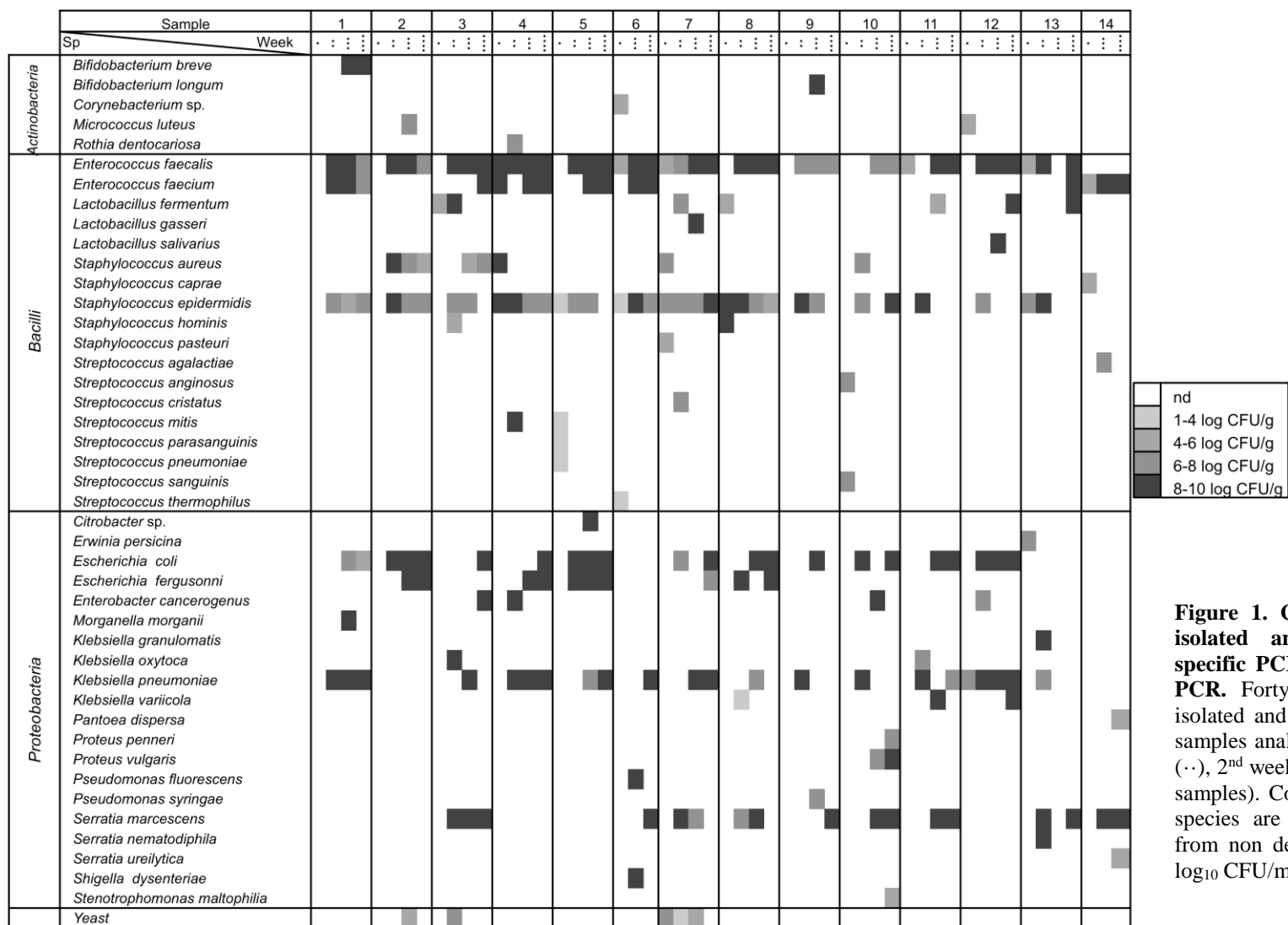


Figure 1. Counts of microbial species isolated and identified by species-specific PCR or 16S rRNA sequencing PCR. Forty-four different species were isolated and identified in some or all the samples analyzed (meconium (·), 1st week (··), 2nd week (···) and 3rd week (····) fecal samples). Concentrations of the identified species are represented in a grey scale from non detected (nd) in white to 8-10 log₁₀ CFU/mL in black.

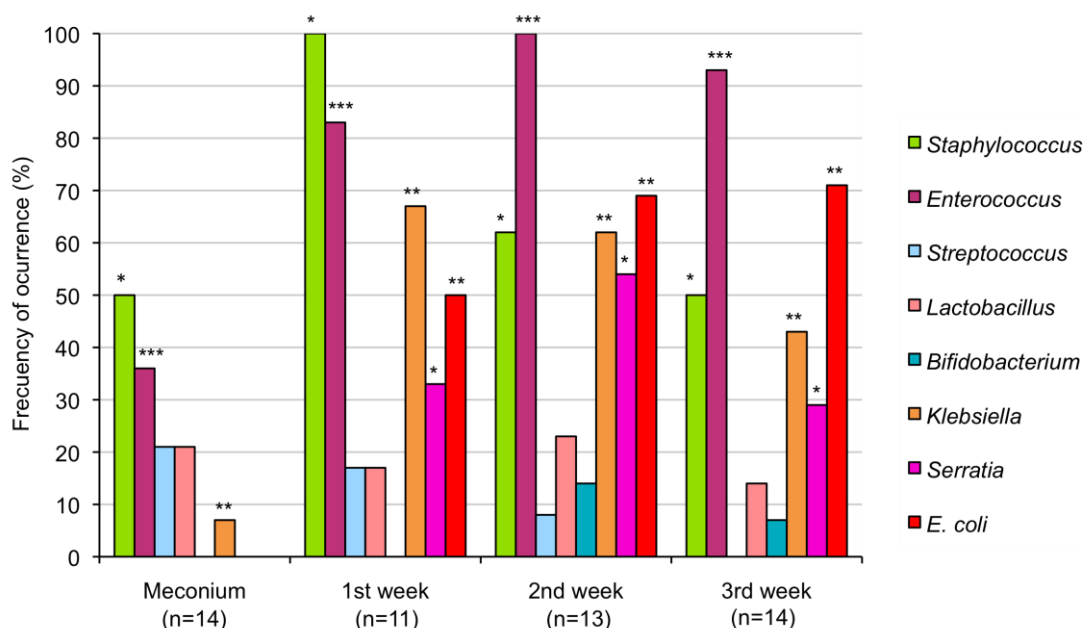


Figure 2. Cultivable bacteria in meconium and fecal samples analyzed in this study. Frequency of occurrence is the percentage of samples in which a particular bacterial genus was detected at each sampling time (meconium, 1st week, 2nd week and 3rd week feces). The total number of weekly samples analyzed is indicated under each sampling time. Results of the Fisher exact probability test (Freeman-Halton extension for a 2×4 contingency table) are shown by asterisks. * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$.

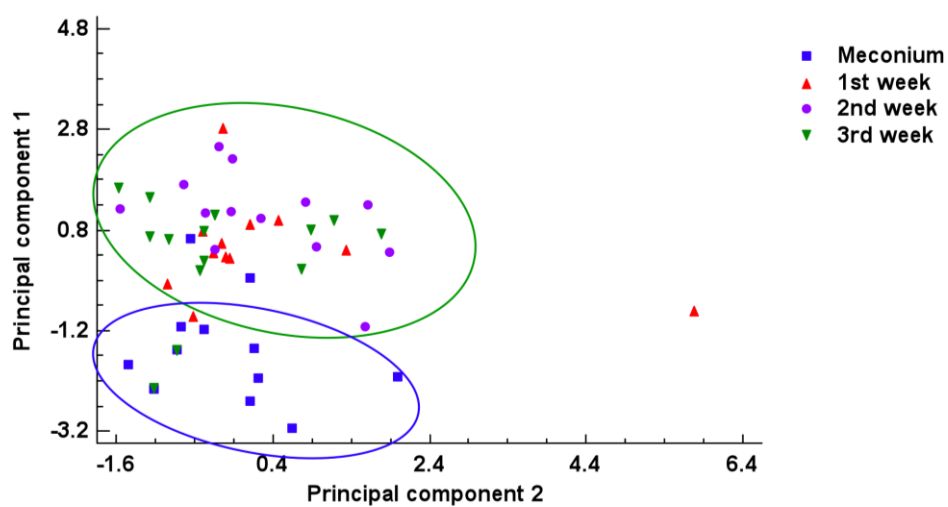


Figure 3. Principal component analysis (PCA) of microbiological profiles of cultivable bacteria. PCA was performed based on the bacterial counts of cultivable bacteria detected at each sampling time: meconium, 1st, 2nd and 3rd week feces.

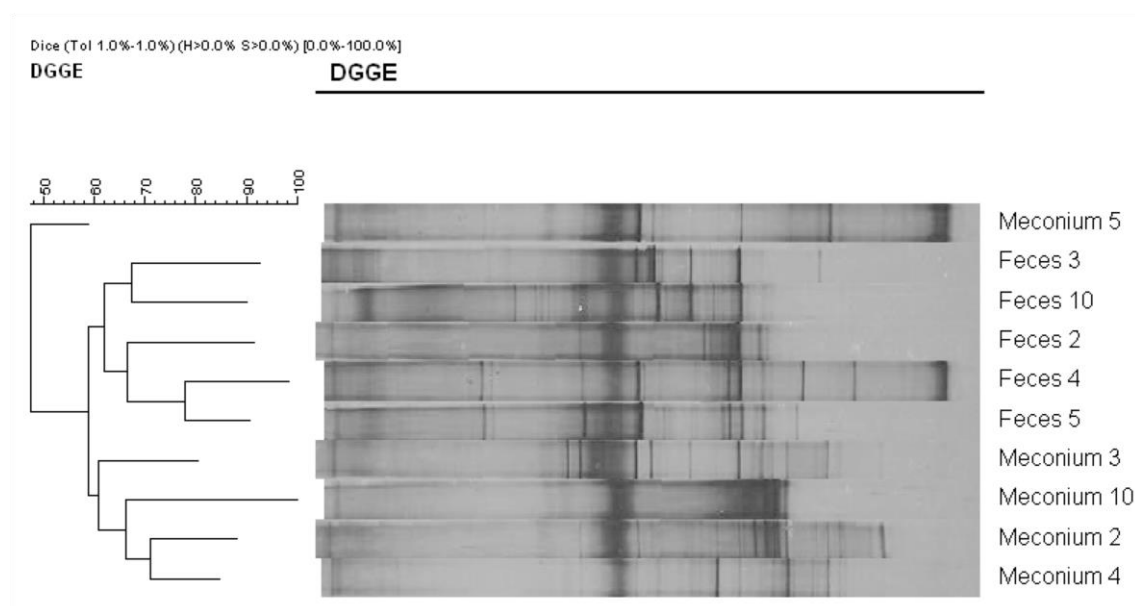


Figure 4. Cluster analysis of DGGE profiles. The analysis was performed using the Neighbor Joining method based on the Dice similarity coefficient in meconium and 3rd week feces from infants 2, 3, 4, 5, and 10.



Figure 5. Phylogenetic fingerprints of the meconium and 3rd week fecal microbiota of 14 preterm infants. The highest phylogenetic level of specificity of probes is described on the right side of the figure. Darkness of the spot corresponds to the bacterial abundance in the sample. Pearson correlation and Ward's clustering method were used.

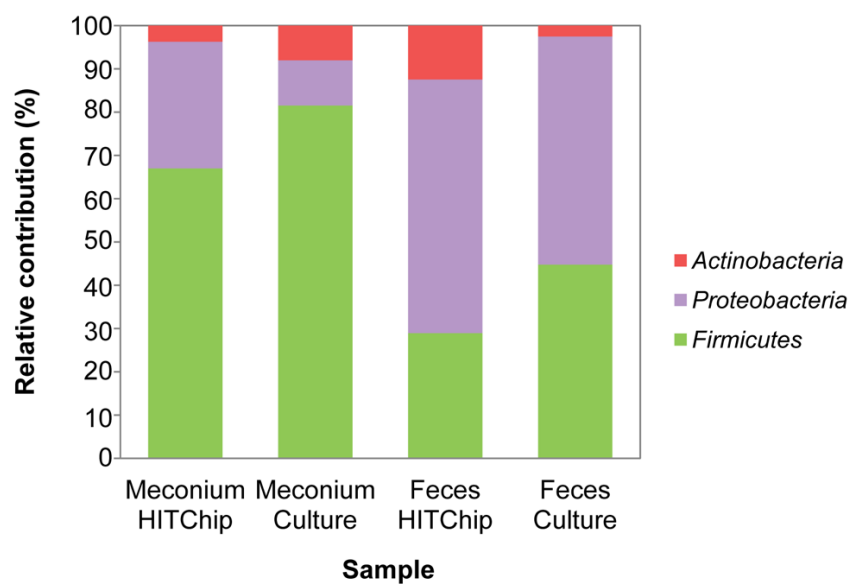


Figure 6. Phyla in the microbiota of meconium and feces analyzed by HITChip and culture-based techniques. The relative contribution of the phyla to the microbiota of meconium and 3rd week fecal samples of fourteen infants detected by culture techniques is shown. In the figure, data for these phyla obtained by HITChip is compared.

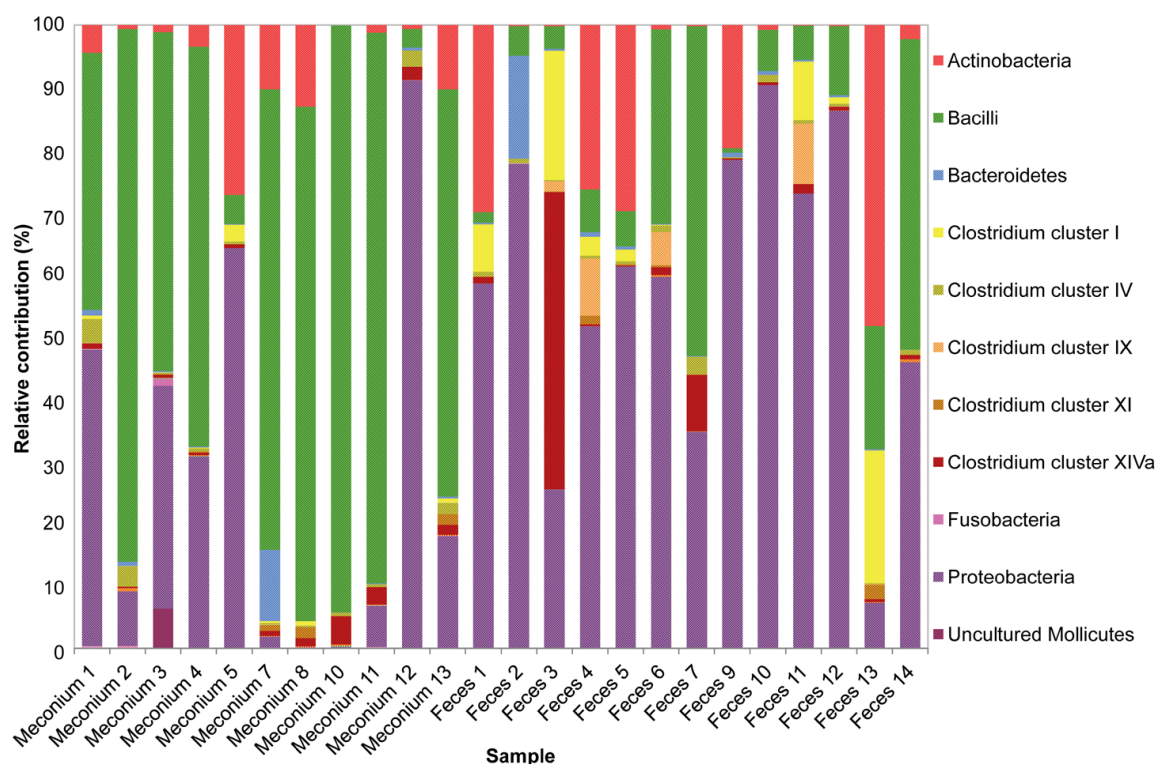


Figure 7. Relative contribution of the phylum/order-like phylogroups to the microbiota of studied infants assessed by HITChip. Phylum/order-like phylogroups detected in meconium and 3rd week fecal samples by HITChip are presented. Only phylum/order-like phylogroups that contributed for at least 0.5% to a given profile are shown.

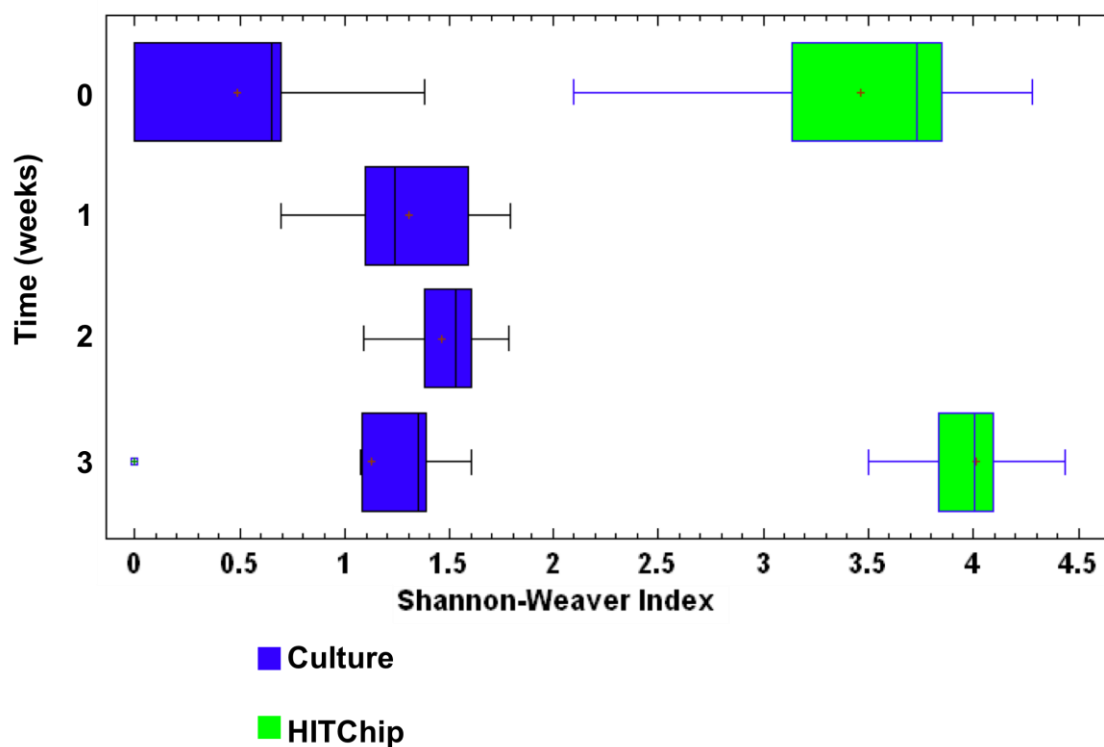


Figure 8. Shannon-Weaver diversity indices from culture and HITChip results. Boxes in blue represent Shannon-Weaver diversity index obtained with culture techniques in meconium (0 week), 1st, 2nd and 3rd week feces. Boxes in green represent Shannon-Weaver diversity index obtained with HITChip in meconium (0 week) and 3rd week feces.

Table 1. Demographic data for the infant cohort.

Infant	Gestational age (week)	Delivery mode	Gender	Birth weight (g)	Sample collection (day of life)
1	31	Vaginal	Male	2,190	0, 7, 14, 21
2	30	Cesarean section	Male	1,550	0, 7, 14, 21
3	27	Cesarean section	Female	1,080	0, 7, 14, 21
4	30	Cesarean section	Male	2,030	0, 7, 14, 21
5	30	Vaginal	Male	1,760	0, 7, 14, 21
6	24	Cesarean section	Female	600	0, 14, 21
7	27	Vaginal	Male	1,540	0, 7, 14, 21
8	26	Cesarean section	Female	790	0, 7, 14, 21
9	32	Vaginal	Female	1,310	0, 7, 14, 21
10	26	Vaginal	Female	920	0, 7, 14, 21
11	29	Cesarean section	Female	1,040	0, 7, 14, 21
12	31	Vaginal	Female	1,430	0, 7, 14, 21
13	24	Cesarean section	Female	750	0, 7, 21
14	27	Vaginal	Female	1,040	0, 14, 21

Table 2. Clinical characteristics of the preterm infants recruited in this study.

Infant	Hospital stay (days)	Antibiotherapy (days)	Mechanical ventilation (days)	Parenteral nutrition (days)	Nasogastric feeding tube (days)
1	26	3	0	3	18
2	42	3	0	5	38
3	60	4	0.5	3	48
4	27	3	2	0	26
5	27	0	0	0	26
6	113	5	9	8	107
7	68	4	2	5	58
8	84	7	0.5	6	70
9	28	3	0	0	21
10	102	15	26	8	97
11	47	2	0	5	45
12	37	3	0	4	35
13	92	8	1	14	83
14	68	7	0	7	62
Mean (95% CI)	58.64 (41.35; 75.93)	3.5 (3.0-7.0)*	0.25 (0.00-1.75)*	4.85 (2.66; 7.05)	52.40 (36.03; 68.82)

*Median (IQR).

Table 3. Microbial groups isolated from meconium and feces of preterm neonates in this study.

Microorganism	Meconium (N=14)		1 st week feces (N=12)		2 nd week feces (N=13)		3 rd week feces (N=14)		P-value**
	n	Mean (95% CI)*	n	Mean (95% CI)	n	Mean (95% CI)	n	Mean (95% CI)	
<i>Staphylococcus</i>	7	6.48 (3.95; 9.01)	12	7.84 (7.38; 8.31)	8	7.05 (6.26; 7.83)	7	7.22 (6.29; 8.15)	0.037
<i>Enterococcus</i>	5	6.15 (3.64; 8.66)	10	8.73 (8.28; 9.18)	13	8.63 (8.13; 9.14)	13	8.26 (7.41; 9.11)	0.003
<i>Streptococcus</i>	3	4.77 (0.07; 9.46)	2	7.86	1	6.40	0		0.236
<i>Lactobacillus</i>	3	5.27 (2.83; 7.70)	2	7.52	4	7.19 (2.48; 11.90)	2	6.23	0.884
<i>Bifidobacterium</i>	0		0		2	9.12	1	9.53	0.145
Other G+	2	5.20	1	7.70	1	7.70	0		0.625
<i>Klebsiella</i>	1	7.27	8	9.18 (8.80; 9.55)	8	8.95 (8.13; 9.78)	6	8.72 (8.11; 9.32)	0.004
<i>Serratia</i>	0		4	8.73 (6.82; 10.64)	7	9.16 (8.80; 9.53)	4	9.22 (7.80; 10.63)	0.009
<i>E. coli</i>	0		6	8.91 (7.89; 9.92)	9	9.05 (8.55; 9.55)	10	8.75 (7.97; 9.53)	0.003
Other G-	1	6.38	1	9.22	5	8.76 (7.33; 10.18)	4	8.40 (5.51; 11.30)	0.118
Yeast	1	6.08	1	7.70	2	5.20	0		0.603

*Mean bacterial counts were expressed as log₁₀ CFU/mL.

**Friedman's tests.

N, total number of samples.

n, number of samples where a specific microbial group was detected.

Other Gram-positive bacteria included the following genera: *Corynebacterium*, *Micrococcus* and *Rothia*.

Other Gram-negative bacteria included the following genera: *Citrobacter*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Morganella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella* and *Stenotrophomonas*.

Table 4. Abundance of genus-like bacterial groups detected in meconium and 3rd week feces using the HITChip microarray.

Phylum/order	Genus-like phylogenetic group [‡]	Meconium samples	3 rd week fecal samples	P-value*
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium</i>	3.28 (2.55; 4.01)	4.07 (3.21; 4.93)	0.140
	<i>Micrococcaceae</i>	3.06 (2.21; 3.92)	2.97 (2.59; 3.35)	0.957
	<i>Propionibacterium</i>	3.63 (3.16; 4.11)	2.27 (1.97-2.77)**	<u>0.004</u>
Bacteroidetes	<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	2.38 (1.83; 2.92)	3.48 (3.15; 3.82)	<u>0.005</u>
	<i>Prevotella tanneriae et rel.</i>	2.06 (1.09; 3.04)	1.22 (0.64; 1.81)	<u>0.040</u>
Bacilli	<i>Aerococcus</i>	2.87 (2.06; 3.69)	3.36 (3.01; 3.72)	0.165
	<i>Bacillus</i>	3.53 (2.94; 4.11)	3.22 (2.87; 3.57)	0.270
	<i>Enterococcus</i>	3.98 (3.23; 4.72)	4.90 (4.62; 5.18)	<u>0.025</u>
	<i>Granulicatella</i>	2.76 (2.14; 3.38)	3.83 (3.50; 4.16)	<u>0.029</u>
	<i>Lactobacillus gasseri et rel.</i>	3.03 (2.54; 3.51)	3.43 (3.01; 3.85)	0.449
	<i>Lactobacillus plantarum et rel.</i>	4.43 (3.71; 5.15)	2.38 (2.05; 2.71)	<u>0.000</u>
	<i>Lactobacillus salivarius et rel.</i>	3.18 (2.46; 3.91)	3.56 (3.26; 3.86)	0.468
	<i>Lactococcus</i>	3.23 (2.44; 4.02)	1.63 (0.54; 2.71)	0.065
	<i>Staphylococcus</i>	3.79 (2.97; 4.61)	3.08 (2.60; 3.56)	0.182
	<i>Streptococcus bovis et rel.</i>	3.26 (2.90; 3.63)	2.76 (2.39-3.09)**	0.361
	<i>Streptococcus intermedius et rel.</i>	3.72 (3.12; 4.32)	2.60 (1.91; 3.28)	<u>0.018</u>
	<i>Streptococcus mitis et rel.</i>	4.25 (3.71; 4.79)	2.95 (2.33; 3.58)	<u>0.006</u>
	<i>Weissella et rel.</i>	2.40 (1.54; 3.25)	2.83 (2.20; 3.47)	0.263
Clostridium cluster I	<i>Clostridia</i>	2.88 (2.18; 3.57)	3.80 (2.93; 4.67)	<u>0.013</u>
Clostridium cluster IV	<i>Clostridium leptum et rel.</i>	2.86 (2.36; 3.35)	2.99 (2.52; 3.46)	0.717
	<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	2.91 (2.36; 3.45)	1.45 (1.09-1.72)	0.089
	<i>Sporobacter termitidis et rel.</i>	3.03 (2.35; 3.71)	3.39 (2.97; 3.82)	0.203
Clostridium cluster IX	<i>Veillonella</i>	1.08 (-0.01; 2.17)	2.90 (1.95; 3.85)	<u>0.034</u>
Clostridium cluster XI	<i>Clostridium difficile et rel.</i>	2.79 (2.21; 3.36)	3.06 (2.57; 3.54)	<u>0.013</u>
Clostridium cluster XIVa	<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	2.45 (1.93; 2.96)	2.43 (2.12; 2.73)	0.961
	<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	2.29 (1.80; 2.80)	2.16 (1.42; 2.89)	0.985
	<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	2.39 (1.85; 2.94)	1.55 (1.34-1.68)**	0.111
	<i>Ruminococcus obeum et rel.</i>	2.47 (1.94; 3.00)	1.92 (1.49; 2.34)	0.114
	<i>Anaerobiospirillum</i>	2.13 (1.66; 2.61)	3.93 (3.47; 4.40)	<u>0.001</u>
	<i>Aquabacterium</i>	2.86 (2.15; 3.58)	0.28 (-0.86; 1.42)	<u>0.001</u>
	<i>Burkholderia</i>	3.14 (2.27; 4.00)	1.69 (1.15; 2.23)	0.074
Proteobacteria	<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	3.69 (2.79; 4.59)	4.78 (4.46; 5.10)	0.096
	<i>Escherichia coli et rel.</i>	3.63 (2.54; 4.72)	5.47 (5.18; 5.75)	<u>0.043</u>
	<i>Haemophilus</i>	3.31 (2.49; 4.12)	4.25 (4.05; 4.46)	<u>0.026</u>
	<i>Klebsiella pneumoniae et rel.</i>	3.90 (2.88; 4.93)	5.33 (5.06-5.38)**	<u>0.034</u>
	<i>Leminorella</i>	2.66 (2.04; 3.29)	3.08 (2.56; 3.60)	0.822
	<i>Proteus et rel.</i>	3.05 (2.23; 3.87)	3.89 (3.61-4.33)**	0.259
	<i>Pseudomonas</i>	3.31 (2.49; 4.12)	4.19 (3.98; 4.41)	<u>0.038</u>
	<i>Serratia</i>	3.01 (2.18; 3.83)	3.95 (3.74; 4.16)	<u>0.031</u>
	<i>Sutterella wadsworthia et rel.</i>	3.57 (2.99; 4.13)	3.38 (3.22-3.45)**	0.864
	<i>Vibrio</i>	3.45 (2.55; 4.34)	4.50 (4.37-4.52)**	0.303
	<i>Xanthomonadaceae</i>	2.81 (1.93; 3.69)	2.50 (2.04; 2.96)	<u>0.001</u>
	<i>Yersinia et rel.</i>	3.51 (2.51; 4.50)	4.91 (4.65; 5.18)	<u>0.042</u>

[‡]The genus-like phylogenetic groups shown contributed, at least, 0.5% to the microbial profile of a given sample.

*Kruskal-Wallis tests.

[‡]Mean (95% CI) of the log-transformed signal intensities.

**Median (IQR) of the log-transformed signal intensities.

Significant changes in abundance of genus-like bacterial groups underlined (*P* values < 0.05).

Supporting Information Legends

Table S1A1. Normalized hybridization signal for all 23 Level 1 (phylum-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Phylum-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Actinobacteria</i>	54200	664363	3558	2587	7101	3596	26451	656165	405151	487047	8858	62346	3777
<i>Asteroleplasma</i>	0	2	27	0	0	3	0	9	0	2	3	0	0
<i>Bacilli</i>	499732	37086	483222	73067	341342	72692	484197	171829	68780	91964	396274	446503	1025083
<i>Bacteroidetes</i>	11003	5519	3816	254266	1012	5987	1196	18570	1464	8414	1839	68952	1870
<i>Clostridium</i> cluster I	6682	169695	274	166	323	411114	883	74423	40667	30246	1692	1865	243
<i>Clostridium</i> cluster III	88	3	1	1	40	0	65	65	6	0	71	187	15
<i>Clostridium</i> cluster IV	46299	16700	18604	9910	1775	3948	3836	11887	6291	7844	13746	1555	54575
<i>Clostridium</i> cluster IX	0	135	0	28	0	31926	56	228399	1	77	67011	277	294
<i>Clostridium</i> cluster XI	586	1163	44	780	445	2579	1312	34491	241	3144	4195	5557	1278
<i>Clostridium</i> cluster XIII	2	1	0	25	5	2	2	14	0	3	154	50	24
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	11544	22980	1205	694	2973	946564	2951	7655	8784	2387	16184	4878	176029
<i>Clostridium</i> cluster XV	697	175	2960	656	438	644	1149	716	50	152	3870	465	1196
<i>Clostridium</i> cluster XVI	36	0	18	2	797	153	589	5	0	2	40	14	478
<i>Clostridium</i> cluster XVII	2	0	15	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	184	67	15	4	1	0	25	34	7	32	52	0	36
<i>Cyanobacteria</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8	0
<i>Fusobacteria</i>	0	0	0	0	6786	0	3	0	0	0	0	146	2
<i>Lentisphaerae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteobacteria</i>	576447	1293526	49516	1192575	224532	503888	231713	1284085	952668	998427	756335	10437	670384
<i>Spirochaetes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uncultured Clostridiales	361	503	32	538	57	125	53	586	137	221	446	4	485
Uncultured Mollicutes	97	3	28	4	39695	799	363	262	3	14	37	202	28
<i>Verrucomicrobia</i>	3408	257	1934	1	144	280	209	110	334	103	0	581	873

Table S1A2. Normalized hybridization signal for all 23 Level 1 (phylum-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Phylum-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Actinobacteria</i>	67867	339610	252	13103	6234	1429	8858	2374	79022	682326	31425
<i>Asteroleplasma</i>	0	9	0	8	0	1	15	0	0	0	1
<i>Bacilli</i>	428000	12073	337650	112156	454036	90869	43620	146929	499920	279275	681539
<i>Bacteroidetes</i>	103	13537	88	10402	603	4197	6869	4389	2349	2520	354
<i>Clostridium</i> cluster I	3290	59	14	281	48	155750	105	13571	5055	301765	233
<i>Clostridium</i> cluster III	389	0	20	0	29	6	12	0	351	6	25
<i>Clostridium</i> cluster IV	1334	2893	1878	20417	2120	9356	37219	5602	14110	2421	10317
<i>Clostridium</i> cluster IX	13	0	0	130	15	159043	0	60	17	1030	53
<i>Clostridium</i> cluster XI	8900	43	245	265	215	396	366	599	12945	32074	630
<i>Clostridium</i> cluster XIII	4	0	0	8	0	4	0	17	9	41	48
<i>Clostridium</i> cluster XIVa	6762	4070	16278	7061	14272	25553	31756	7950	12103	6354	9245
<i>Clostridium</i> cluster XV	683	56	831	268	638	170	543	581	1250	1513	6365
<i>Clostridium</i> cluster XVI	0	0	547	0	374	39	3	3	3	13	71
<i>Clostridium</i> cluster XVII	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1
<i>Clostridium</i> cluster XVIII	0	7	27	0	23	0	0	6	99	62	57
<i>Cyanobacteria</i>	22	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
<i>Fusobacteria</i>	303	0	7	0	8	0	0	0	526	0	0
<i>Lentisphaerae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Proteobacteria</i>	305	1345765	532	1534471	33539	1202823	1318806	1143457	136961	102917	627245
<i>Spirochaetes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Uncultured Clostridiales	10	638	207	320	151	330	1384	340	7	96	304
Uncultured Mollicutes	358	0	44	0	66	181	19	18	671	210	0
<i>Verrucomicrobia</i>	0	29	18	0	1191	18	21	0	27	149	0

Table S2A1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Actinomycetaceae</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aerococcus</i>	3789	515	83	3002	1773	810	6573	3684	149	972	18235	10439	3880
<i>Aeromonas</i>	451	12	0	0	8	0	66	5	55	3	8	15	5
<i>Akkermansia</i>	3408	257	1934	1	144	280	209	110	334	103	0	581	873
<i>Alcaligenes faecalis et rel.</i>	2147	0	34	0	75	0	43	0	69	0	0	53	0
<i>Allistipes et rel.</i>	343	287	817	2788	177	697	195	1931	100	790	172	8063	218
<i>Anaerobiospirillum</i>	1419	462	165	50585	190	17102	102	24413	1007	13590	1075	45	4499
<i>Anaerofustis</i>	507	47	28	440	295	603	790	446	14	96	2845	51	797
<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	91	219	11	130	394	3623	114	820	51	141	196	413	630
<i>Anaerotruncus colihominis et rel.</i>	17	49	156	0	0	88	29	22	3	2	5	0	16
<i>Anaerovorax odorimutans et rel.</i>	0	0	0	0	47	9	0	29	0	0	30	18	6
<i>Aneurinibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aquabacterium</i>	27931	5	730	0	1016	0	4730	2	797	38	0	470	0
<i>Asteroleplasma et rel.</i>	0	2	27	0	0	3	0	9	0	2	3	0	0
<i>Atopobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	531	0
<i>Bacillus</i>	2887	548	8341	1906	3725	554	4947	2552	480	725	9665	31791	3960
<i>Bacteroides fragilis et rel.</i>	58	380	5	169979	13	647	5	1929	77	853	308	760	223
<i>Bacteroides intestinalis et rel.</i>	0	25	7	71	0	0	0	1	2	7	0	240	0
<i>Bacteroides ovatus et rel.</i>	0	583	0	359	1	8	0	407	125	316	45	1183	4
<i>Bacteroides plebeius et rel.</i>	2	14	18	282	10	1	6	9	4	5	2	1218	1
<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	412	3349	579	11924	184	4423	50	13586	766	5990	764	4557	1156
<i>Bacteroides stercoris et rel.</i>	27	40	48	15275	3	0	7	19	4	17	0	1135	1
<i>Bacteroides uniformis et rel.</i>	0	5	5	46209	1	0	3	1	0	2	29	623	8
<i>Bacteroides vulgatus et rel.</i>	0	13	11	487	0	0	0	3	2	3	0	9039	0
<i>Bifidobacterium</i>	7593	663698	709	391	2254	2463	6839	554863	403599	486502	668	3430	312
<i>Bilophila et rel.</i>	11	0	24	0	62	0	202	0	37	0	0	58	0
<i>Brachyspira</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	533	150	40	42	116	24263	205	322	4	4	171	201	46548
<i>Bulleidia moorei et rel.</i>	36	0	14	2	601	83	467	5	0	2	39	14	336
<i>Burkholderia</i>	160520	510	1421	4	2745	44	10104	277	2127	265	19	1605	16
<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	1445	45	659	48	104	3347	224	37	105	11	23	333	38750

M, meconium; F, feces

Table S2A2. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Actinomycetaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aerococcus</i>	18207	208	10	1662	86	894	24	3859	19368	8113	17431
<i>Aeromonas</i>	11	8	0	9	92	9	49	0	34	1	0
<i>Akkermansia</i>	0	29	18	0	1191	18	21	0	27	149	0
<i>Alcaligenes faecalis et rel.</i>	0	0	0	2	68	0	0	0	694	0	0
<i>Allistipes et rel.</i>	23	1539	10	1265	70	477	641	489	183	116	36
<i>Anaerobiospirillum</i>	0	44938	0	23358	92	12862	39	31229	21	610	0
<i>Anaerofustis</i>	11	18	638	198	479	103	0	392	166	1143	4940
<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	242	166	5177	80	4065	73	448	105	359	1045	230
<i>Anaerotruncus colihominis et rel.</i>	0	2	28	1	39	1	19	0	0	20	3
<i>Anaerovorax odorimutans et rel.</i>	51	0	15	0	31	4	25	2	31	1	11
<i>Aneurinibacillus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Aquabacterium</i>	11	27	0	24	658	0	35	0	4896	2	0
<i>Asteroleplasma et rel.</i>	0	9	0	8	0	1	15	0	0	0	1
<i>Atopobium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus</i>	50278	141	189	1201	746	594	287	2315	45277	4752	18278
<i>Bacteroides fragilis et rel.</i>	1	1497	4	1167	7	411	485	457	22	194	20
<i>Bacteroides intestinalis et rel.</i>	0	0	0	0	5	0	0	0	36	16	0
<i>Bacteroides ovatus et rel.</i>	0	84	0	11	0	8	8	0	3	375	34
<i>Bacteroides plebeius et rel.</i>	2	4	0	4	1	2	6	1	9	6	1
<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	14	10079	24	7711	72	2726	3205	3065	232	1488	158
<i>Bacteroides stercoris et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	17	31	0
<i>Bacteroides uniformis et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	11	3	0
<i>Bacteroides vulgatus et rel.</i>	4	0	0	0	22	0	0	0	92	8	0
<i>Bifidobacterium</i>	35	339303	54	12110	2008	923	1207	529	2382	679266	1495
<i>Bilophila et rel.</i>	0	0	0	9	17	0	1	0	576	2	2
<i>Brachyspira</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	202	5	2101	19	1645	97	151	19	379	207	172
<i>Bulleidia moorei et rel.</i>	0	0	434	0	286	22	3	3	3	12	64
<i>Burkholderia</i>	63	135	2	451	2371	36	238	2	17768	455	3
<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	8	36	3080	22	3175	62	121	23	28	14	16

Table S2B1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Campylobacter</i>	43	0	0	0	601	5	13	2	2	0	0	27	0
<i>Catenibacterium mitsuokai et rel.</i>	2	0	15	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0
<i>Clostridia</i>	6682	169695	274	166	323	411114	883	74423	40667	30246	1692	1865	243
<i>Clostridium cellulosi et rel.</i>	1286	86	412	53	25	421	75	73	21	19	198	188	953
<i>Clostridium colinum et rel.</i>	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	272
<i>Clostridium difficile et rel.</i>	548	306	36	780	396	924	1308	33382	54	2951	4148	5488	1269
<i>Clostridium felsineum et rel.</i>	38	857	7	0	1	1645	4	1079	187	193	17	51	3
<i>Clostridium leptum et rel.</i>	12115	351	4616	290	760	1872	894	670	220	83	9306	269	556
<i>Clostridium nexile et rel.</i>	143	189	5	9	22	220470	18	214	47	18	5	17	86
<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	17593	55	6517	16	344	74	1254	4	254	14	28	414	30498
<i>Clostridium ramosum et rel.</i>	179	0	9	4	1	0	25	7	0	0	52	0	36
<i>Clostridium sphenoides et rel.</i>	233	19	6	7	27	568	41	4	1	0	28	34	14147
<i>Clostridium stercorarium et rel.</i>	88	3	1	1	40	0	65	65	6	0	71	187	15
<i>Clostridium symbiosum et rel.</i>	4921	180	183	37	1216	40298	1237	731	196	182	56	1052	3672
<i>Clostridium thermocellum et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Collinsella</i>	385	136	90	314	480	124	431	232	88	87	711	9370	224
<i>Coproacillus catenaformis et rel.</i>	5	67	5	0	0	0	0	27	7	32	0	0	0
<i>Coprococcus eutactus et rel.</i>	828	11	24	21	53	2082	152	4	3	1	42	433	40537
<i>Corynebacterium</i>	447	44	12	13	9	135	117	25231	12	20	151	163	0
<i>Desulfovibrio et rel.</i>	0	0	0	83	0	10	0	1390	0	0	604	10	2
<i>Dialister</i>	0	0	0	0	0	670	0	37	0	6	21	0	4
<i>Dorea formicigenerans et rel.</i>	428	181	9	11	56	56452	39	135	10	5	16	75	5492
<i>Eggerthella lenta et rel.</i>	23	54	0	32	20	26	56	55	10	31	45	351	19
<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	18210	152638	551	5766	25060	67420	4070	34505	105533	33197	161927	402	94839
<i>Enterococcus</i>	30134	30806	1448	44469	198333	35431	20932	142077	11650	82186	277987	70887	84801
<i>Escherichia coli et rel.</i>	65899	277478	7241	922278	43514	305215	37785	839774	236935	498759	87138	590	172778
<i>Eubacterium bifforme et rel.</i>	0	0	4	0	196	70	122	0	0	0	2	0	142
<i>Eubacterium cylindroides et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	121	90	50	165	103	96756	215	281	2	40	1079	20	1027
<i>Eubacterium limosum et rel.</i>	190	127	2932	216	142	40	359	271	35	56	1025	414	399
<i>Eubacterium rectale et rel.</i>	497	57	7	0	92	72670	154	48	2	0	7	69	1288
<i>Eubacterium siraeum et rel.</i>	4	1833	88	0	0	15	322	738	583	1165	16	9	147
<i>Eubacterium ventriosum et rel.</i>	27	73	0	0	0	80568	0	59	0	0	0	3	6

Table S2B2. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Campylobacter</i>	12	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
<i>Catenibacterium mitsuokai et rel.</i>	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	1
<i>Clostridia</i>	3290	59	14	281	48	155750	105	13571	5055	301765	233
<i>Clostridium cellulosi et rel.</i>	426	57	48	148	41	34	367	36	953	49	231
<i>Clostridium colinum et rel.</i>	28	0	0	0	0	0	0	0	37	0	0
<i>Clostridium difficile et rel.</i>	8742	43	220	265	176	377	340	596	12761	29694	620
<i>Clostridium felsineum et rel.</i>	108	0	0	0	0	16	0	2	153	2380	0
<i>Clostridium leptum et rel.</i>	46	432	121	19833	285	4936	2089	311	3492	114	9485
<i>Clostridium nexile et rel.</i>	5	14	161	158	153	23	52	8	37	162	20
<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	21	4	918	52	919	40	213	12	4836	7	43
<i>Clostridium ramosum et rel.</i>	0	0	27	0	23	0	0	6	99	20	57
<i>Clostridium sphenoides et rel.</i>	7	0	675	1	513	24	85	2	12	4	29
<i>Clostridium stercorarium et rel.</i>	389	0	20	0	29	6	12	0	351	6	25
<i>Clostridium symbiosum et rel.</i>	1627	51	476	67	679	1246	261	32	3242	1740	37
<i>Clostridium thermocellum et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Collinsella</i>	291	156	165	221	236	133	357	99	315	74	271
<i>Coprobacillus cateniformis et rel.</i>	0	7	0	0	0	0	0	0	0	43	0
<i>Coprococcus eutactus et rel.</i>	720	0	867	6	693	53	32	9	1136	34	57
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	36	14	0	62	50	80	75	4840
<i>Desulfovibrio et rel.</i>	0	166	0	78	0	234	128	22	0	0	0
<i>Dialister</i>	0	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0
<i>Dorea formicigenerans et rel.</i>	91	15	315	9	302	68	163	9	176	30	4
<i>Eggerthella lenta et rel.</i>	17	42	15	44	35	39	56	23	136	29	22
<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	17	53967	0	410417	1952	78364	226107	84132	24556	6180	139211
<i>Enterococcus</i>	84601	9984	72	94285	1022	30912	638	113418	91048	207671	570530
<i>Escherichia coli et rel.</i>	15	982302	3	491080	2721	479007	239044	581186	2977	48778	37611
<i>Eubacterium bifforme et rel.</i>	0	0	113	0	87	17	0	0	0	1	7
<i>Eubacterium cylindroides et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	22	5	37	205	33	28	13	143	64	382	1749
<i>Eubacterium limosum et rel.</i>	672	38	192	70	159	67	543	188	1084	371	1425
<i>Eubacterium rectale et rel.</i>	100	0	463	79	430	70	16	0	287	61	44
<i>Eubacterium siraeum et rel.</i>	27	6	132	0	95	0	0	0	29	1757	15
<i>Eubacterium ventriosum et rel.</i>	9	0	16	108	8	0	36	0	4	11	7

Table S2C1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Faecalibacterium prausnitzii et rel.</i>	177	0	2	33	2	4	9	35	0	8	1	248	1013
<i>Fusobacteria</i>	0	0	0	0	6786	0	3	0	0	0	0	146	2
<i>Gemella</i>	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	0	1	0
<i>Granulicatella</i>	4768	1614	88	8213	5157	1495	6719	8692	547	3593	45500	451	10658
<i>Haemophilus</i>	2648	38212	6099	20969	9649	7839	30334	25723	19876	38193	20726	88	10284
<i>Helicobacter</i>	57	0	0	0	806	7	18	2	3	0	0	36	0
<i>Klebsiella pneumoniae et rel.</i>	43706	418724	9866	108754	61718	51302	54212	213365	319827	234329	213227	885	198990
<i>Lachnobacillus bovis et rel.</i>	113	10	0	0	22	20278	21	23	0	0	0	79	390
<i>Lachnospira pectinoschiza et rel.</i>	279	135	126	36	100	60391	195	697	15	91	242	131	384
<i>Lactobacillus cateniformis et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus gasseri et rel.</i>	2896	483	8602	1724	3114	451	8149	2278	469	935	9498	406	56168
<i>Lactobacillus plantarum et rel.</i>	199554	52	453631	288	32534	136	197321	968	46016	285	315	35930	112
<i>Lactobacillus salivarius et rel.</i>	11380	951	2494	4203	3808	1422	174491	4927	479	1835	22127	2412	5756
<i>Lactococcus</i>	99893	8	3527	0	861	0	14401	0	3485	27	0	8280	337
<i>Leminorella</i>	1191	5318	455	118	935	1759	107	232	3541	66	6380	21	1742
<i>Megamonas hypermegale et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megasphaera elsdenii et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcaceae</i>	1494	308	130	1612	2426	326	2238	1477	234	313	6417	40681	3138
<i>Mitsuokella multiacida et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	254	0
<i>Moraxellaceae</i>	5203	4260	231	2843	303	798	1253	2891	1388	2002	2834	31	2301
<i>Novosphingobium</i>	0	0	42	0	4	101	58	6	0	0	6	0	0
<i>Oceanospirillum</i>	0	273	0	0	0	0	0	127	56	146	0	0	0
<i>Oscillospira guillermundii et rel.</i>	150	1	1069	29	206	5	57	43	2	3	224	52	40
Outgrouping <i>Clostridium</i> cluster	449	21296	29	138	307	103582	90	3987	8307	1848	14233	151	14646
<i>Oxalobacter formigenes et rel.</i>	34903	41	1008	5	342	141	1432	35	410	34	3	477	634
<i>Papillibacter cinnamivorans et rel.</i>	481	0	3	3	14	0	24	1	0	0	8	16	8842
<i>Parabacteroides distasonis et rel.</i>	2397	244	1315	301	357	92	284	206	107	115	79	3373	65
<i>Peptococcus niger et rel.</i>	0	110	0	0	0	26452	0	76	0	0	0	3	6
<i>Peptostreptococcus anaerobius et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus micros et rel.</i>	2	1	0	25	5	2	2	14	0	3	154	50	24

Table S2C2. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Faecalibacterium prausnitzii et rel.</i>	583	34	18	30	19	0	0	6	267	0	1
<i>Fusobacteria</i>	303	0	7	0	8	0	0	0	526	0	0
<i>Gemella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	86	0	0
<i>Granulicatella</i>	550	786	0	6359	52	3180	23	13782	1642	24088	36168
<i>Haemophilus</i>	12	5720	0	34448	905	19733	28561	27752	494	3493	40011
<i>Helicobacter</i>	16	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae et rel.</i>	40	134631	8	248680	4707	263241	395401	239876	36568	24670	114871
<i>Lachnobacillus bovis et rel.</i>	0	0	1612	0	1409	0	0	0	34	3	7
<i>Lachnospira pectinoschiza et rel.</i>	197	7	539	82	422	64	58	40	344	1105	357
<i>Lactobacillus catenaformis et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus gasseri et rel.</i>	30	196	348	1670	2228	13386	520	3094	1308	5034	13075
<i>Lactobacillus plantarum et rel.</i>	1162	219	155	272	192823	53	38493	83	4132	326	5590
<i>Lactobacillus salivarius et rel.</i>	527	411	9	3308	1544	1745	185	6904	3428	11695	15834
<i>Lactococcus</i>	105	0	153	0	250	46	18	0	41500	0	0
<i>Leminorella</i>	0	2426	0	12703	75	2845	7408	2785	419	28	7867
<i>Megamonas hypermegale et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Megasphaera elsdenii et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Methylobacterium</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Micrococcaceae</i>	67336	55	18	541	37	300	172	1086	64210	2694	9901
<i>Mitsuokella multiacida et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Moraxellaceae</i>	0	954	0	3518	146	1924	11438	1648	900	148	1472
<i>Novosphingobium</i>	0	0	0	0	0	15	3	0	0	3	0
<i>Oceanospirillum</i>	0	168	0	0	0	0	0	0	0	149	0
<i>Oscillospira guillermoidii et rel.</i>	149	0	35	8	72	4	15	23	88	70	121
Outgrouping <i>Clostridium</i> cluster	310	3689	163	5789	156	23337	30011	7511	666	1285	6433
<i>Oxalobacter formigenes et rel.</i>	0	11	7	31	974	10	56	1	2601	36	3
<i>Papillibacter cinnamivorans et rel.</i>	0	0	368	1	304	2	7	1	1	2	11
<i>Parabacteroides distasonis et rel.</i>	6	91	3	123	38	115	278	49	704	90	51
<i>Peptococcus niger et rel.</i>	12	0	0	0	2	0	0	0	15	8	4
<i>Peptostreptococcus anaerobius et rel.</i>	0	0	10	0	9	0	0	0	0	0	0
<i>Peptostreptococcus micros et rel.</i>	4	0	0	8	0	4	0	17	9	41	48

Table S2D1. Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M1	F1	M2	F2	M3	F3	M4	F4	M5	F5	F6	M7	F7
<i>Phascolarctobacterium faecium et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Prevotella melaninogenica et rel.</i>	0	12	34	27	11	2	116	61	39	5	24	18409	3
<i>Prevotella oralis et rel.</i>	0	33	8	133	6	0	125	7	47	13	0	2264	0
<i>Prevotella ruminicola et rel.</i>	6	70	0	219	0	0	0	33	9	46	0	339	0
<i>Prevotella tanneriae et rel.</i>	6119	30	48	114	69	0	238	33	31	5	0	4313	4
<i>Propionibacterium</i>	44259	116	2617	226	1913	522	16770	74307	1208	94	865	7821	84
<i>Proteus et rel.</i>	8417	17823	47	4080	2864	7121	2124	2326	8854	614	21165	30	6555
<i>Pseudomonas</i>	2553	37824	6125	17607	8801	4803	30784	24678	19805	37977	15086	81	9580
<i>Roseburia intestinalis et rel.</i>	338	0	0	0	4	15346	0	13	0	0	0	13	5277
<i>Ruminococcus bromii et rel.</i>	26	2	50	20	11	0	45	25	0	2	120	0	57
<i>Ruminococcus callidus et rel.</i>	71	8	179	7	2	3	118	10	0	1	19	5	26
<i>Ruminococcus gnavus et rel.</i>	133	210	7	26	29	84464	18	175	14	20	30	12	53
<i>Ruminococcus lactaris et rel.</i>	10	63	0	6	0	60338	1	57	1	4	4	3	27
<i>Ruminococcus obeum et rel.</i>	934	50	52	18	328	1066	227	48	26	23	51	1834	2798
<i>Serratia</i>	1308	19107	3050	8901	4929	3589	15169	12528	9939	19044	11331	45	5231
<i>Sporobacter termitidis et rel.</i>	14351	14314	5487	9450	400	1465	984	10253	5207	6547	3748	353	6782
<i>Staphylococcus</i>	13526	999	1971	7567	26425	637	1048	2736	1214	140	9399	209287	51660
<i>Streptococcus bovis et rel.</i>	21501	287	709	818	4133	9	6333	246	383	134	571	1211	522609
<i>Streptococcus intermedius et rel.</i>	17485	122	479	260	10513	163	8610	1095	694	192	1147	12576	62631
<i>Streptococcus mitis et rel.</i>	65308	413	1344	500	50817	601	34159	2167	3212	543	1001	62253	222061
<i>Subdoligranulum variable at rel.</i>	28	0	25	9	12	0	25	14	0	0	73	0	5643
<i>Sutterella wadsworthia et rel.</i>	116690	2268	3087	1720	8554	2838	13363	2569	3204	1591	2412	2026	1048
<i>Tannerella et rel.</i>	1638	433	916	6088	178	116	166	340	149	248	414	13024	187
Uncultured <i>Bacteroidetes</i>	1	2	5	9	4	1	0	4	2	1	1	411	0
Uncultured <i>Chroococcales</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	8	0
Uncultured Clostridiales I	0	0	0	0	7	0	0	0	0	3	0	0	0
Uncultured Clostridiales II	361	503	32	538	49	125	53	586	137	218	446	4	485
Uncultured <i>Mollicutes</i>	97	3	28	4	39695	799	363	262	3	14	37	202	28
Uncultured <i>Selenomonadaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i>	0	25	0	28	0	4804	56	228286	1	71	66979	21	284
<i>Vibrio</i>	12558	64041	8185	23633	9178	10095	17682	31561	32576	31508	33155	2456	23824
<i>Victivallis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella et rel.</i>	26584	290	505	120	151	30984	474	407	3	395	828	577	450
<i>Wissella et rel.</i>	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonadaceae</i>	58690	477	664	25	862	2204	3458	174	579	115	647	536	327
<i>Yersinia et rel.</i>	11892	254053	492	25205	42317	21495	4603	67499	186051	86955	178593	451	137727

Table S2D2 . Normalized hybridization signal intensity for all 131 Level 2 (genus-like) phylogenetic groups targeted by the HITChip.

Genus-like taxa	M8	F9	M10	F10	M11	F11	M12	F12	M13	F13	F14
<i>Phascolarctobacterium faecium et rel.</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Prevotella melaninogenica et rel.</i>	14	13	16	15	159	14	22	1	157	0	3
<i>Prevotella oralis et rel.</i>	1	0	25	0	163	0	0	0	19	23	0
<i>Prevotella ruminicola et rel.</i>	0	8	0	0	0	0	0	0	53	56	0
<i>Prevotella tanneriae et rel.</i>	0	0	0	0	30	0	0	0	484	10	0
<i>Propionibacterium</i>	188	54	0	151	3904	34	7003	587	11899	188	14897
<i>Proteus et rel.</i>	0	7731	0	45729	349	22592	38032	9178	360	107	24845
<i>Pseudomonas</i>	12	5465	0	25059	1017	17698	26215	25869	538	3452	34095
<i>Roseburia intestinalis et rel.</i>	0	0	446	0	358	0	0	0	0	0	2
<i>Ruminococcus bromii et rel.</i>	0	2	71	4	64	2	17	29	0	70	228
<i>Ruminococcus callidus et rel.</i>	5	4	84	5	76	9	59	3	28	8	22
<i>Ruminococcus gnavus et rel.</i>	8	44	14	385	20	70	172	27	31	30	22
<i>Ruminococcus lactaris et rel.</i>	0	12	90	19	84	18	55	6	4	9	0
<i>Ruminococcus obeum et rel.</i>	3184	25	47	31	128	320	82	16	5263	229	59
<i>Serratia</i>	6	2867	0	18691	459	9935	14486	13186	222	1742	20989
<i>Sporobacter termitidis et rel.</i>	71	2352	20	333	168	4326	34422	5174	4392	305	74
<i>Staphylococcus</i>	268432	90	87	2278	630	160	713	408	266490	1028	982
<i>Streptococcus bovis et rel.</i>	907	23	1303	620	2432	3829	389	308	3815	1510	1239
<i>Streptococcus intermedius et rel.</i>	662	1	124629	55	103351	3408	443	94	3627	2662	1480
<i>Streptococcus mitis et rel.</i>	2445	12	210120	243	148470	10901	1887	115	11615	6676	319
<i>Subdoligranulum variable at rel.</i>	6	0	35	1	36	2	10	6	26	20	83
<i>Sutterella wadsworthia et rel.</i>	61	2408	491	19917	3336	23586	3823	1282	16175	1647	2832
<i>Tannerella et rel.</i>	36	219	7	104	35	443	2220	327	326	106	50
Uncultured <i>Bacteroidetes</i>	1	2	0	2	0	1	3	0	0	0	1
Uncultured <i>Chroococcales</i>	22	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0
Uncultured Clostridiales I	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
Uncultured Clostridiales II	10	638	207	320	151	330	1377	340	7	96	304
Uncultured <i>Mollicutes</i>	358	0	44	0	66	181	19	18	671	210	0
Uncultured <i>Selenomonadaceae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Veillonella</i>	0	0	0	130	14	159038	0	60	0	1023	49
<i>Vibrio</i>	14	13036	5	45901	6425	30260	88393	32626	1414	2764	38134
<i>Victivallis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Weissella et rel.</i>	93	2	575	203	401	21760	1	2549	6582	5720	612
<i>Wissella et rel.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Xanthomonadaceae</i>	6	283	1	24985	1025	405	3400	229	7723	60	62
<i>Yersinia et rel.</i>	10	88521	15	129381	6143	240069	235951	92452	18028	8590	165238

Table S3A1. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

		<i>Staphylococcus</i>				<i>Enterococcus</i>				<i>Streptococcus</i>			
		Meconium		Feces		Meconium		Feces		Meconium		Feces	
		Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>
		(%)*	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value
Gestational age (wk)	24-26 (n=4)	21.43	0.790	21.43	0.760	7.14	0.253	21.43	0.250	14.29	0.407	0.00	1.000
	27-30 (n=4)	14.29		14.29		21.43		28.57		0.00		0.00	
	>30 (n=6)	14.29		35.71		7.14		42.86		7.14		0.00	
Delivery mode	Cesarean section (n=7)	28.57	0.500	35.71	0.720	21.43	0.500	42.86	0.499	7.14	0.500	0.00	1.000
	Vaginal (n=7)	21.43		35.71		14.29		50.00		14.29		0.00	
Birth weight (g)	<1000 (n=4)	21.43	0.359	21.43	0.131	7.14	1.000	21.43	0.286	14.29	0.231	0.00	1.000
	1000-1500 (n=5)	7.14		14.29		14.29		35.71		0.00		0.00	
	>1500 (n=5)	21.43		35.71		14.29		35.71		7.14		0.00	
Antibiotherapy (days)	> 3 (n=7)	35.71	0.143	35.71	0.720	21.43	0.500	42.86	0.499	14.29	0.500	0.00	1.000
	< 3 (n=7)	14.29		35.71		14.29		50.00		7.14		0.00	
Parenteral nutrition (days)	0 (n=3)	14.29	0.111	21.43	0.595	7.14	1.000	21.43	0.571	7.14	0.258	0.00	1.000
	0-5 (n=6)	7.14		28.57		14.29		42.86		0.00		0.00	
	> 5 (n=5)	28.57		21.43		14.29		28.57		14.29		0.00	
Nasogastric feeding tube (days)			0.296				0.238				0.615		
	< 50 (n=9)	14.29		50.00	0.454	7.14		64.29	0.357	7.14		0.00	1.000
	> 50 (n=5)	35.71		21.43		28.57		28.57		14.29		0.00	
Mechanical ventilation	Yes (n=7)	35.71	0.143	42.86	0.279	21.43	0.500	42.86	0.499	14.29	0.500	0.00	1.000
	No (n=7)	14.29		28.57		14.29		50.00		7.14		0.00	
Hospital stay (days)	< 35 (n=5)	14.29	0.500	28.57	0.545	7.14	0.378	35.71	0.642	7.14	0.725	0.00	1.000
	> 35 (n=9)	35.71		42.86		28.57		57.14		14.29		0.00	
Meconium expulsion (h)	< 12 (n=7)	28.57	0.500	35.71	0.720	14.29	0.500	50.00	0.499	7.14	0.500	0.00	1.000
	> 12 (n=7)	21.43		35.71		21.43		42.86		14.29		0.00	
Type of feeding	Breast-fed (n=7)	21.43	0.500	28.57	0.279	21.43	0.500	42.86	0.499	14.29	0.500	0.00	1.000
	Mixed-fed (n=7)	28.57		42.86		14.29		50.00		7.14		0.00	

Table S3A2. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

	<i>Lactobacillus</i>				<i>Bifidobacterium</i>				Other G+			
	Meconium		Feces		Meconium		Feces		Meconium		Feces	
	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>
	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value
Gestational age (wk)	7.14	0.209	0.00	0.736	0.00	1.000	0.00	1.000	7.14	1.000	0.00	1.000
	14.29		7.14		0.00		0.00		0.00		0.00	
	0.00		14.29		0.00		7.14		7.14		0.00	
Delivery mode	14.29	0.500	7.14	0.500	0.00	1.000	0.00	0.499	7.14	0.769	0.00	1.000
	7.14		14.29		0.00		7.14		7.14		0.00	
Birth weight (g)	7.14	1.000	0.00		0.00	1.000	0.00	0.999	7.14	0.725	0.00	1.000
	7.14		7.14	0.725	0.00		0.00		7.14		0.00	
	7.14		14.29		0.00		7.14		0.00		0.00	
Antibiotherapy (days)	21.43	0.096	7.14	0.500	0.00	1.000	0.00	0.499	7.14	0.769	0.00	1.000
	0.00		14.29		0.00		7.14		7.14		0.00	
Parenteral nutrition (days)	0.00	0.753	7.14	0.382	0.00	1.000	0.00	0.999	0.00	1.000	0.00	1.000
	14.29		14.29		0.00		7.14		7.14		0.00	
	7.14		0.00		0.00		0.00		7.14		0.00	
Nasogastric feeding tube (days)	7.14	0.615	14.29	0.725	0.00	1.000	7.14	0.643	0.00	0.308	0.00	1.000
	14.29		7.14		0.00		0.00		14.29		0.00	
Mechanical ventilation	21.43	0.096	14.29	0.500	0.00	1.000	0.00	0.499	7.14	0.769	0.00	1.000
	0.00		7.14		0.00		7.14		7.14		0.00	
Hospital stay (days)	21.43	0.231	14.29	0.275	0.00	1.000	7.14	0.357	7.14	0.604	0.00	1.000
	0.00		7.14		0.00		0.00		7.14		0.00	
Meconium expulsion (h)	7.14	0.500	14.29	0.500	0.00	1.000	7.14	0.499	7.14	0.769	0.00	1.000
	14.29		7.14		0.00		0.00		7.14		0.00	
Type of feeding	14.29	0.500	14.29	0.500	0.00	1.000	7.14	0.499	14.29	0.231	0.00	1.000
	7.14		7.14		0.00		0.00		0.00		0.00	

Table S3A3. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

		<i>Klebsiella</i>				<i>Serratia</i>				<i>E. coli</i>			
		Meconium		Feces		Meconium		Feces		Meconium		Feces	
		Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>
		(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value
Gestational age (wk)	24-26 (n=4)	0.00	1.000	14.29	0.999	0.00	1.000	21.43	<u>0.020</u>	0.00	1.000	14.29	0.481
	27-30 (n=4)	0.00		21.43		0.00		21.43		0.00		14.29	
	>30 (n=6)	7.14		28.57		0.00		0.00		0.00		35.71	
	Cesarean section (n=7)	0.00	0.500	35.71		0.00	1.000	21.43	0.703	0.00	1.000	35.71	
Delivery mode	Vaginal (n=7)	7.14		28.57		0.00		21.43		0.00		28.57	0.499
Birth weight (g)	<1000 (n=4)	0.00	0.999	14.29	0.800	0.00	1.000	21.43	0.334	0.00	1.000	14.29	0.151
	1000-1500 (n=5)	7.14		21.43		0.00		14.29		0.00		14.29	
	>1500 (n=5)	0.00		28.57		0.00		7.14		0.00		35.71	
Antibiotherapy (days)	> 3 (n=7)	0.00	0.500	42.86	0.499	0.00	1.000	42.86	<u>0.002</u>	0.00	1.000	21.43	0.133
	< 3 (n=7)	7.14		35.71		0.00		0		0.00		42.86	
Parenteral nutrition (days)	0 (n=3)	0.00	1.000	14.29	0.413	0.00	1.000	0.00	0.112	0.00	1.000	14.29	0.413
	0-5 (n=6)	7.14		35.71		0.00		14.29		0.00		35.71	
	> 5 (n=5)	0.00		14.29		0.00		28.57		0.00		14.29	
Nasogastric feeding tube (days)	< 50 (n=9)	0.00	0.571	50.00	0.202	0.00	1.000	14.29	0.060	0.00	1.000	50.00	0.202
	> 50 (n=5)	7.14		14.29		0.00		28.57		0.00		14.29	
Mechanical ventilation	Yes (n=7)	0.00	0.500	35.71	0.499	0.00	1.000	35.71	<u>0.050</u>	0.00	1.000	28.57	0.499
	No (n=7)	7.14		28.57		0.00		7.14		0.00		35.71	
Hospital stay (days)	< 35 (n=5)	7.14	0.357	28.57	0.377	0.00	1.000	0.00	<u>0.027</u>	0.00	1.000	28.57	0.378
	> 35 (n=9)	0.00		35.71		0.00		42.86		0.00		35.71	
Meconium expulsion (h)	< 12 (n=7)	7.14	0.500	35.71	0.499	0.00	1.000	14.29	0.296	0.00	1.000	35.71	0.499
	> 12 (n=7)	0.00		28.57		0.00		28.57		0.00		28.57	
Type of feeding	Breast-fed (n=7)	7.14	0.500	0.50	0.725	0.00	1.000	14.29	0.296	0.00	1.000	42.86	0.133
	Mixed-fed (n=7)	0.00		14.29		0.00		28.57		0.00		21.43	

Table S3A4. Associations between demographic and clinical data and the presence of the isolated genera or microbial group during at least two weeks in the analyzed assessed using Fisher's tests.

		Other G- Meconium		Feces		Yeast Meconium		Feces	
		Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>	Frequency	<i>P</i>
		(%)	value	(%)	value	(%)	value	(%)	value
Gestational age (wk)	24-26 (n=4)	7.14	0.571	0.00	1.000	0.00	0.571	7.14	0.473
	27-30 (n=4)	0.00		0.00		7.14		7.14	
	>30 (n=6)	0.00		7.14		0.00		0.00	
Delivery mode	Cesarean section (n=7)	7.14	0.500	0.00	0.499	7.14	0.500	0.00	0.231
	Vaginal (n=7)	0.00		7.14		0.00		14.29	
Birth weight (g)	<1000 (n=4)	7.14	0.286	0.00	0.999	0.00	1.000	7.14	0.725
	1000-1500 (n=5)	0.00		0.00		0.00		0.00	
	>1500 (n=5)	0.00		7.14		7.14		7.14	
Antibiotherapy (days)	> 3 (n=7)	7.14	0.500	0.00	0.499	7.14	0.500	14.29	0.231
	< 3 (n=7)	0.00		7.14		0.00		0.00	
Parenteral nutrition (days)	0 (n=3)	0.00	0.571	7.14	0.214	0.00	1.000	0.00	0.999
	0-5 (n=6)	0.00		0.00		7.14		7.14	
	> 5 (n=5)	7.14		0.00		0.00		7.14	
Nasogastric feeding tube (days)	< 50 (n=9)	0.00	0.571	7.14	0.643	0.00	0.571	0.00	0.110
	> 50 (n=5)	7.14		0.00		7.14		14.29	
Mechanical ventilation	Yes (n=7)	7.14	0.500	7.14	0.499	7.14	0.500	14.29	0.231
	No (n=7)	0.00		0.00		0.00		0.00	
Hospital stay (days)	< 35 (n=5)	0.00	0.643	7.14	0.357	0.00	0.643	0.00	0.396
	> 35 (n=9)	7.14		0.00		7.14		14.29	
Meconium expulsion (h)	< 12 (n=7)	0.00	0.500	7.14	0.499	0.00	0.500	0.00	0.231
	> 12 (n=7)	7.14		0.00		7.14		14.29	
Type of feeding	Breast-fed (n=7)	7.14	0.500	7.14	0.499	0.00	0.500	0.00	0.231
	Mixed-fed (n=7)	0.00		0.00		7.14		14.28	

n, number of samples.

*Percentage of samples where a genus or microbial group was isolated at least two weeks.

Significant associations are underlined (*P* values ≤ 0.05).

Table S4. Dominant phylotypes in meconium and 3rd week fecal samples detected by HITChip.

	Meconium samples												3 rd week fecal samples														
Species-like phylotype	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	
<i>Enterobacter cloacae</i>	5	0.93	0.57	1.64	2.29	5.27	0.03	0.00	0.00	0.14	7.60	1.83	12	4.83	1.70	1.14	1.90	3.37	4.68	2.90	1.61	7.19	2.87	4.90	0.47	1.38	
<i>Enterococcus faecalis</i>	4	1.98	0.07	9.07	1.35	0.57	0.37	0.08	0.00	0.05	0.01	1.24	11	1.02	1.91	0.35	2.00	3.05	11.74	2.71	0.45	4.93	1.58	7.13	6.97	2.77	
<i>Escherichia coli</i>	3	2.14	0.06	1.61	0.38	2.01	0.01	0.00	0.00	0.11	0.41	0.01	10	0.79	20.44	6.70	9.90	8.83	0.91	2.32	17.19	8.67	7.04	14.80	1.06	0.00	
<i>Hafnia alvei</i>	5	0.74	0.08	6.31	0.54	10.54	0.07	0.00	0.00	1.18	11.02	2.26	10	9.23	0.13	0.70	1.81	4.13	12.96	6.43	3.64	5.50	12.98	4.80	0.49	11.17	
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	4	0.80	0.57	2.86	2.28	5.15	0.04	0.00	0.00	0.28	5.63	0.74	11	4.41	1.63	0.33	2.11	3.63	3.79	2.25	1.97	1.91	4.11	4.18	0.42	2.75	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	8	9.74	1.96	2.78	11.91	1.84	3.13	0.08	0.02	24.08	1.40	0.21	0	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus reuteri</i>	3	0.54	44.89	0.38	4.00	0.12	0.21	0.01	0.00	1.03	0.10	0.04	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Serratia liquefaciens</i>	4	0.79	0.57	2.81	2.27	4.91	0.04	0.00	0.00	0.28	5.22	0.73	11	4.18	1.63	0.31	2.11	3.63	3.62	2.18	1.84	1.58	4.02	3.99	0.42	2.51	
<i>Shigella dysenteriae</i>	2	0.61	0.05	0.68	0.10	3.52	0.03	0.00	0.00	0.05	4.86	0.10	11	3.40	6.64	1.24	4.16	4.58	1.40	1.74	5.45	2.60	4.30	6.15	0.50	0.00	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	1.12	0.35	3.86	0.14	0.08	34.57	51.66	0.02	0.12	0.05	34.62	1	0.05	0.28	0.03	0.11	0.01	0.74	2.66	0.01	0.13	0.01	0.03	0.07	0.07	
<i>Streptococcus viridans</i>	6	1.87	0.05	7.21	3.60	0.15	9.95	0.27	58.37	28.43	0.08	0.65	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.99	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Unc. <i>Streptococcus</i> sp. NB4D2																				0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Total contribution																				34	25.19	32.16	32.52	36.92	45.99	10.41	20.66

n, number of samples were the phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals.

Table S5. Proteobacterial phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique.

S	146 s-like phylotype	Meconium samples												3 rd week fecal samples													
		n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14
	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	2	0.36	0.03	0.52	0.08	2.04	0.01	0.00	0.00	0.03	1.71	0.04	9	1.51	4.26	0.93	3.18	2.47	0.65	1.27	6.67	2.96	3.47	2.60	0.30	0.00
	<i>Citrobacter braakii</i>	1	0.17	0.01	0.33	0.05	0.40	0.01	0.00	0.00	0.03	1.92	0.33	3	0.57	0.05	0.52	0.06	0.05	1.56	0.40	0.25	3.28	0.39	0.55	0.03	1.73
	<i>Citrobacter farmeri</i>	2	0.23	0.01	0.29	0.04	1.46	0.01	0.00	0.00	0.01	1.71	0.04	8	1.29	2.54	0.45	2.14	1.97	0.54	0.41	2.44	1.25	1.81	1.80	0.20	0.00
	<i>Citrobacter freundii</i>	1	0.16	0.01	0.27	0.05	0.16	0.01	0.00	0.00	0.03	1.52	0.33	3	0.34	0.05	0.50	0.06	0.05	1.39	0.33	0.12	2.95	0.31	0.36	0.03	1.49
	<i>Citrobacter murlinae</i>	1	0.17	0.01	0.33	0.05	0.40	0.01	0.00	0.00	0.03	1.92	0.33	3	0.57	0.05	0.52	0.06	0.05	1.56	0.40	0.25	3.28	0.39	0.55	0.03	1.73
	<i>Citrobacter sedlakii</i>	0	0.26	0.01	0.35	0.05	0.60	0.01	0.00	0.00	0.03	0.36	0.01	8	0.31	4.29	1.01	2.79	1.75	0.24	0.36	5.16	2.51	1.97	2.54	0.19	0.00
	<i>Citrobacter werkmanii</i>	1	0.13	0.01	0.29	0.02	0.30	0.01	0.00	0.00	0.02	1.72	0.33	3	0.40	0.08	0.53	0.07	0.04	1.24	0.26	0.26	4.56	0.32	0.37	0.03	1.56
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0.17	0.02	1.60	0.07	1.73	0.01	0.00	0.00	0.17	1.78	0.06	6	1.41	0.02	0.13	0.40	0.73	1.76	0.88	0.75	1.31	1.43	1.08	0.06	1.77
	<i>Enterobacter cloacae</i> *	5	0.93	0.57	1.64	2.29	5.27	0.03	0.00	0.00	0.14	7.60	1.83	12	4.83	1.70	1.14	1.90	3.37	4.68	2.90	1.61	7.19	2.87	4.90	0.47	1.38
	<i>Escherichia coli</i> *	3	2.14	0.06	1.61	0.38	2.01	0.01	0.00	0.00	0.11	0.41	0.01	10	0.79	20.44	6.70	9.90	8.83	0.91	2.32	17.19	8.67	7.04	14.80	1.06	0.00
	<i>Escherichia fergusonii</i>	0	0.61	0.02	0.69	0.11	0.94	0.01	0.00	0.00	0.06	0.41	0.01	8	0.37	8.03	2.10	3.75	3.24	0.32	0.70	6.93	3.32	2.78	5.29	0.36	0.00
	<i>Hafnia alvei</i> *	5	0.74	0.08	6.31	0.54	10.54	0.07	0.00	0.00	1.18	11.02	2.26	10	9.23	0.13	0.70	1.81	4.13	12.96	6.43	3.64	5.50	12.98	4.80	0.49	11.17
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	0.68	0.03	2.11	0.27	4.25	0.03	0.00	0.00	0.20	4.32	0.71	10	3.33	1.06	0.19	1.61	2.46	3.06	1.94	1.68	0.90	3.51	3.02	0.30	1.30
	<i>K pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> *	4	0.80	0.57	2.86	2.28	5.15	0.04	0.00	0.00	0.28	5.63	0.74	11	4.41	1.63	0.33	2.11	3.63	3.79	2.25	1.97	1.91	4.11	4.18	0.42	2.75
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0.11	0.54	0.69	2.03	0.67	0.01	0.00	0.00	0.09	0.90	0.03	2	0.85	0.57	0.12	0.49	1.16	0.56	0.25	0.16	0.68	0.52	0.97	0.12	1.20
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0.11	0.54	0.71	2.05	0.67	0.01	0.00	0.00	0.11	0.91	0.04	2	0.85	0.57	0.13	0.50	1.16	0.63	0.25	0.16	0.79	0.56	0.98	0.12	1.29
	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>arizonae</i>	2	0.26	0.00	0.32	0.05	1.33	0.00	0.00	0.00	0.02	2.49	0.06	8	1.15	4.27	0.71	2.44	1.72	0.48	0.51	4.89	2.31	2.22	2.83	0.20	0.00
	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	0	0.04	0.00	0.06	0.01	0.22	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.01	1	0.16	0.79	0.19	0.61	0.33	0.07	0.04	1.39	0.70	0.62	0.31	0.06	0.00
	<i>Serratia liquefaciens</i> *	4	0.79	0.57	2.81	2.27	4.91	0.04	0.00	0.00	0.28	5.22	0.73	11	4.18	1.63	0.31	2.11	3.63	3.62	2.18	1.84	1.58	4.02	3.99	0.42	2.51
	<i>Serratia marcescens</i>	2	0.11	0.54	0.79	2.01	0.67	0.01	0.00	0.00	0.09	1.00	0.03	2	0.86	0.58	0.18	0.50	1.17	0.89	0.27	0.17	1.10	0.60	0.99	0.12	1.53
	<i>Shigella dysenteriae</i> *	2	0.61	0.05	0.68	0.10	3.52	0.03	0.00	0.00	0.05	4.86	0.10	11	3.40	6.64	1.24	4.16	4.58	1.40	1.74	5.45	2.60	4.30	6.15	0.50	0.00
	<i>Yersinia bercovieri</i>	1	0.11	0.00	0.18	0.03	0.69	0.00	0.00	0.00	0.01	1.30	0.02	0	0.67	0.92	0.21	0.51	0.55	0.36	0.26	0.94	0.69	0.65	0.98	0.05	0.25
	<i>Yersinia frederiksenii</i>	1	0.06	0.00	0.13	0.02	0.60	0.00	0.00	0.00	0.01	1.05	0.02	0	0.58	0.30	0.06	0.20	0.33	0.31	0.18	0.24	0.37	0.39	0.53	0.03	0.25
	<i>Yersinia rohdei</i>	1	0.07	0.00	0.12	0.02	0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	2.91	0.06	2	1.00	0.30	0.12	0.20	0.33	0.43	0.23	0.32	1.06	0.53	0.67	0.03	0.41
	Total contribution		9.82	3.70	25.69	14.88	49.24	0.35	0.02	0.01	2.97	62.82	8.13		43.08	60.91	18.99	41.57	47.72	43.41	26.76	64.51	61.45	57.78	65.26	5.65	32.33

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals. *Dominant phylotypes in meconium and 3rd week fecal samples.

Table S6. Lactobacilli and lactococci phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique.

	Meconium samples													3 rd week fecal samples													
Species-like phylotype	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14	
<i>Lactobacillus antri</i>	2	0.95	0.83	0.30	1.28	0.15	0.45	0.02	0.00	1.95	0.20	0.03	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus fermentum</i> *	8	9.74	1.96	2.78	11.91	1.84	3.13	0.08	0.02	24.08	1.40	0.21	0	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	0	0.00	0.04	0.06	0.18	0.00	0.02	0.00	0.04	0.09	0.00	0.07	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.46	0.00	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus gastricus</i>	4	1.02	2.54	0.33	1.88	0.16	0.46	0.02	0.00	2.16	0.21	0.03	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	0	0.00	0.03	0.05	0.16	0.00	0.02	0.00	0.04	0.09	0.00	0.06	1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.29	0.00	0.00	0.35	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus lactis</i>	1	0.10	1.36	0.04	0.15	0.02	0.02	0.00	0.01	0.19	0.02	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	
<i>Lactobacillus mucosae</i>	4	2.68	1.13	0.86	4.10	0.57	0.98	0.04	0.01	4.98	0.43	0.07	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus oris</i>	2	0.95	0.82	0.30	1.28	0.15	0.45	0.02	0.00	1.95	0.20	0.03	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus reuteri</i> *	3	0.54	44.89	0.38	4.00	0.12	0.21	0.01	0.00	1.03	0.10	0.04	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	0.47	0.22	0.30	11.30	0.02	0.19	0.04	0.00	0.15	0.01	0.21	0	0.02	0.14	0.04	0.10	0.06	0.87	0.15	0.01	0.10	0.05	0.26	0.41	0.58	
<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i>	1	0.47	0.22	0.30	11.30	0.02	0.19	0.04	0.00	0.15	0.01	0.21	0	0.02	0.14	0.04	0.10	0.06	0.87	0.15	0.01	0.10	0.05	0.26	0.41	0.58	
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	1	0.04	12.89	0.06	0.32	0.01	0.02	0.00	0.00	0.16	0.01	0.00	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactobacillus vaginalis</i> KC19	2	0.54	14.46	0.14	1.21	0.09	0.17	0.00	0.00	0.81	0.10	0.02	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactococcus lactis</i>	2	2.29	0.19	0.05	0.76	0.07	0.39	0.01	0.01	0.02	0.00	1.73	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	3	5.91	0.43	0.09	1.14	0.16	0.98	0.01	0.01	0.01	0.00	3.64	0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Total contribution		25.69	82.00	6.02	50.97	3.38	7.69	0.28	0.15	37.82	2.69	6.37		0.05	0.28	0.07	0.22	0.12	1.76	3.07	0.02	0.20	0.87	0.52	0.83	1.18	

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals.

*Dominant phylotypes in meconium.

Table S7. Bifidobacterial phylotypes detected in meconium and 3rd week fecal samples using HITChip technique.

	Meconium samples												3 rd week fecal samples													
Species-like phylotype	n	1	2	3	4	5	7	8	10	11	12	13	n	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13	14
<i>Bifidobacterium animalis</i>	1	0.23	0.05	0.04	0.18	1.02	0.15	0.00	0.00	0.08	0.03	0.11	4	1.35	0.00	0.01	1.27	1.23	0.01	0.00	0.59	0.07	0.00	0.00	1.95	0.05
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	1	0.01	0.01	0.02	0.07	1.55	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	1.43	0.00	0.01	1.08	1.13	0.00	0.00	1.87	0.04	0.00	0.00	2.31	0.00
<i>Bifidobacterium breve</i>	1	0.03	0.01	0.05	0.09	3.78	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	3.77	0.00	0.02	2.81	4.12	0.00	0.00	1.83	0.04	0.00	0.00	6.39	0.00
<i>Bifidobacterium catenulatum</i>	1	0.01	0.00	0.03	0.02	4.42	0.04	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	4	4.40	0.00	0.01	3.14	5.12	0.00	0.00	0.17	0.01	0.00	0.00	8.09	0.00
<i>Bifidobacterium dentium</i>	1	0.01	0.00	0.01	0.03	1.03	0.04	0.00	0.00	0.01	0.02	0.01	4	1.61	0.00	0.01	1.35	1.61	0.01	0.00	0.69	0.18	0.00	0.00	1.92	0.00
<i>Bifidobacterium gallicum</i>	0	0.23	0.05	0.03	0.15	0.81	0.13	0.00	0.00	0.08	0.03	0.11	5	1.44	0.00	0.01	1.07	1.23	0.01	0.00	1.33	0.03	0.00	0.00	1.99	0.05
<i>Bifidobacterium infantis</i>	1	0.03	0.01	0.05	0.09	4.27	0.03	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	4.44	0.00	0.02	3.25	4.76	0.00	0.00	3.41	0.07	0.01	0.01	7.50	0.00
<i>Bifidobacterium longum</i>	1	0.01	0.01	0.03	0.07	1.99	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	2.02	0.00	0.01	1.48	1.71	0.00	0.00	3.45	0.07	0.01	0.00	3.29	0.00
<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i>	1	0.01	0.01	0.03	0.07	1.96	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	1.98	0.00	0.01	1.46	1.67	0.00	0.00	3.11	0.06	0.01	0.00	3.24	0.00
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	1	0.01	0.01	0.02	0.07	1.55	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.01	5	1.43	0.00	0.01	1.08	1.13	0.00	0.00	1.87	0.04	0.00	0.00	2.31	0.00
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	1	0.01	0.00	0.01	0.01	2.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	4	1.97	0.00	0.01	1.32	2.11	0.00	0.00	0.07	0.01	0.00	0.00	3.24	0.00
Unc. <i>Bifidobacterium</i> sp. 15D	0	0.01	0.00	0.01	0.03	0.94	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	4	1.64	0.00	0.01	1.38	1.47	0.00	0.00	0.65	0.05	0.00	0.00	2.23	0.00
Total contribution		0.61	0.13	0.34	0.87	25.34	0.56	0.01	0.01	0.38	0.08	0.30		27.46	0.02	0.11	20.68	27.28	0.05	0.02	19.04	0.68	0.05	0.04	44.44	0.11

n, number of samples were a given phylotype contribute for, at least, 1% of the hybridization's signals.

**V. PERFIL BACTERIOLÓGICO E INMUNOLÓGICO DEL
INTESTINO DEL RECIÉN NACIDO PREMATURO:
SEGUIMIENTO DURANTE 2 AÑOS**



**V. BACTERIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PROFILE OF
THE PRETERM INFANT GUT: A TWO-YEARS FOLLOW-UP
STUDY**

Manuscrito preparado para ser enviado a
Pediatrics

V.1 SUMMARY

The abnormal colonization pattern of the preterm gut may affect immune maturation and exert a long-term influence on the gut bacterial composition and host health. However, follow-up studies assessing the evolution of the fecal microbiota of infants that were born preterm are very scarce. In this work, the bacterial diversity of fecal samples obtained from sixteen 2-year-old infants was evaluated using a phylogenetic microarray; subsequently, the results were compared with those obtained in a previous study from samples of meconium and feces collected from the same infants while they stayed in the neonatal intensive care unit (NICU). Parallel, the concentration of a wide range of cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins was determined in all the meconium and fecal samples. Globally, a higher bacterial diversity and a lower interindividual variability was observed in 2-year-old feces when compared to the samples obtained during their first days of life. Hospital-associated fecal bacteria that were dominant during the NICU's stay seemed to be replaced, two years later, by genera which use to be predominant in the healthy adult microbiome. The immune profile of the meconium and fecal samples differed depending on the sampling time, suggesting that it may be related to the gut bacterial composition.

V.2 INTRODUCTION

The microbial composition of the gastrointestinal tract in humans undergoes remarkable changes in our life span (Harmsen et al., 2000; Woodmansey, 2007; O'Toole and Claesson, 2010). The most dynamic period of changes in human intestinal microbiota is reported after birth when the scarce bacteria from the intrauterine life make space for a complex microbial community. Traditionally, the development of gut microbiota in term infants involves early colonization by facultative anaerobes that generate a reducing environment, favoring the growth of strictly anaerobic bacteria (Mackie et al., 1999; Fanaro et al., 2003). From an initial low diversity and low complexity, the intestinal bacterial community of the infant will gradually develop and mature, reaching an enduring adult state at around 2-3 years of age (Koenig et al., 2011; Matamoros et al., 2013).

However, the establishment and development of the gut microbiota differs between preterm and healthy term infants (Madan et al., 2012). In the former, several factors, including mother/infant antibiotherapy, Caesarean section, early separation from the parents, delayed enteral feeding, invasive medical procedures or a long stay in the NICU, exert a strong influence on early colonization of the infant gut (Fanaro et al., 2003; Penders et al., 2006; Murgas Torrazza & Neu, 2011). The abnormal gut colonization in preterm infants during their first weeks of life (Magne et al., 2006; Mshvildadze et al., 2010; LaTuga et al., 2011) may affect the maturation of the gut barrier as well as its nutritional and immunological functions (Sharma et al., 2010; Di Mauro et al., 2013).

There is circumstantial evidence that initial microbial gut colonization and the resulting immune and metabolic programming could have a long-lasting influence on the risk for future diseases (Matamoros et al., 2013). However, little is known about the possible influence of gut microbiota on the human immune system and how early bacterial colonization affects the immune maturation (Johansson et al., 2012), particularly among preterm infants (Jacquot et al., 2011). Several studies have assessed immune compounds in saliva, umbilical cord blood or peripheral blood of infants (Blanco-Quiros et al., 2000; Wan et al., 2003; Matoba et al., 2009; Sjogren et al., 2009; Johansson et al., 2012; Lusyati et al., 2013) but few have described the presence of cytokines, chemokines, growth factors or immunoglobulins in fecal samples of preterm babies (Mohan et al., 2008; Richter et al., 2010; Westerbeek et al., 2011).

In this context, the objectives of this study were, firstly, to study if the abnormal initial colonization of preterm babies previously studied (Moles et al., 2013) may affect their fecal bacterial composition when they are 2-year-old by using a phylogenetic microarray (Rajilic-Stojanovic et al., 2009) and, secondly, to characterize and compare the immune profile of the meconium and infants feces obtained from such infants in the first weeks after birth and, also, at the age of 2.

V.3 METHODS

V.3.1 Patients and sampling

This prospective study included sixteen 2-year-old infants that were born prematurely at the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain) (Table 1). Written informed parental consent was obtained for each infant before inclusion in the study, which was approved by the Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos of Madrid (10/017-E). Characteristics to be eligible for enrolment have been described previously (Moles et al, 2013). Relevant clinical data recorded for each infant, such as length of antibiotherapy, parenteral nutrition, nasogastric feeding, mechanical ventilation, hospital stay and type of feeding, are described in Table 2. All infants were fed with human milk (donor milk and/or their own mother's milk) and, occasionally, with preterm formula.

The medical staff of the Department of Neonatology of the hospital had collected first spontaneously evacuated meconium and fecal samples during their stay at the NICU (Moles et al, 2013). Later, when the infants reached 2 years of age, parents were contacted by phone to provide an additional fecal sample if their infants had not taken antibiotics within the previous 2 months. All the samples were stored at -20 °C until analysis and processed as described previously (Moles et al., 2013).

V.3.2 Human Intestinal Tract Chip (HITChip) analysis

DNA extraction from fecal samples was performed following the protocol described in Moles et al. (2013). All the steps for the HITChip microarray analysis, including PCR amplification of 16S rRNA genes, RNA production and labeling, hybridization and data extraction, were performed basically as described by Rajilic-Stojanovic et al. (2009). Then, the PCR products were purified by using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Mannheim, Germany), according to the manufacturer's instructions. *In vitro* transcription of the T7 promoter-carrying 16S rRNA genes was performed using the Riboprobe System (Promega, Madison, WI, USA) while amino-allyl-modified nucleotides were coupled with CyDye using the Post-Labeling Reactive Dye (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Data were extracted from the microarray images using the Agilent Feature Extraction software, version 9.1 (<http://www.agilent.com>), subsequently normalized, and further analyzed using a set of R-based scripts (<http://r-project.org>) in combination with a custom-designed relational database that runs under the MySQL database management system (<http://www.mysql.com>; Nubel et al., 1997). Hierarchical clustering of probe profiles was carried out using the Pearson distance and Ward's minimum variance method.

V.3.3 Immunological analysis

The concentrations of 18 cytokines, chemokines, and growth factors, including interleukins (IL) 1 β , 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12(p70), 13, and 17, interferon-gamma (IFN- γ), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), growth regulated oncogene-alpha (Gro- α), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), were determined in meconium and fecal samples by using the Human Cytokine group I and II assay kits (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) in a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad). Briefly, 0.1 g of fecal samples was suspended in 1 mL of PBS. After homogenization, the samples were centrifuged (14,000 $\times g$, 15 min, 4 °C) and the supernatants (≥ 200 μ L) were collected. Determinations in meconium and fecal samples were carried out in duplicate.

The concentrations of immunoglobulin (Ig) G1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA in the samples were determined using the Bio-Plex Pro Human Isotyping Assay kit (Bio-Rad) using the Bioplex 200 system. For this purpose, the samples were conditioned as described above for cytokine analysis. All analyses were carried out in duplicate following the manufacturer's protocol.

Calibration curves for each analyte were constructed using triplicate values for each known concentration and the Bio-Plex Manager 6.0 software (Bio-Rad).

V.3.4 Statistical analysis

Quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The richness and diversity of the meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired sample *t*-tests were applied to determine differences between the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time. Chi-square independency tests were used to evaluate differences in the detection frequencies of immune compounds. One-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to compare differences in the concentration of immune compounds at different sampling times. The immune compounds were further analyzed applying exploratory multivariate analyses, such as principal component analysis (PCA), multiple discriminant analysis (MDA) and cluster analysis (CA). Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

For comprehensive multivariate statistical analyses, Canoco software for Windows 5.0 (Wageningen, The Netherlands) was used. Redundancy analysis was performed to assess correlations between the microbial groups detected by the HITChip and the sample characteristics. The log-transformed hybridization signals of 131 genus-level phylogenetic groups targeted by the HITChip were used as biological variables. Gestational age, gender, birth weight, Z score, vaginal vs cesarean section,

age, antibiotics (mother and/or infant), time of first passage of meconium, type of nutrition, time of enteral and parenteral nutrition, sepsis and hospital stay were included as explanatory variables. The Monte Carlo Permutation Procedure was used to assess significance of the variation in large data sets.

V.4 RESULTS

V.4.1 Characteristics of the infants

The 16 infants that participated in this study had, at birth, a mean gestational age of 28 weeks (ranging from 24 to 32 weeks) and a mean birth weight of 1,220 g (ranging from 600 to 2,030 g) (Table 1). Half of the infants (n=8) were born by Cesarean section. All of them, except one, received antibacterial prophylaxis at least for the first 3 days of life, and nine needed mechanical ventilation (Table 2). Infants were fed either with their own mother's milk, donor milk and/or preterm formula by nasogastric feeding tube for, at least, 18 days after delivery. The time required for spontaneous delivery of the first meconium oscillated between the first minutes to day 5 after birth.

V.4.2 HITChip analysis

The microarray datasets of the 16 fecal samples collected two years after birth (~730 d) and those previously obtained from meconium and feces collected in the third week of life (~21 d) (Moles et al., 2013) were acquired and hierarchically clustered in a heat map based on the signal intensity of the 3,699 distinct HITChip oligonucleotide probes (Figure 1). The meconium samples (with the exception of those corresponding to infants 4, 6 and 22), the third week's fecal samples and the 2-year's ones clustered in three different groups according to the sampling times (Figure 1).

The relative contribution of the major phyla was assessed as the percentage of the phylum/order taxa among the total microbiome detected in each fecal sample (Figure 2). Globally, approximately two thirds of the DNA sequences retrieved from the meconium samples were ascribed to the *Firmicutes* phylum (63.4%). The phylum *Proteobacteria* dominated in the 21 days fecal samples (about 60.0%) but became a minor one in the 2-years samples (2.5%). Interestingly, *Firmicutes* was again the most abundant phylum (78.5%) in the later samples, followed by *Actinobacteria* (9.9%) and *Bacteroidetes* (7.7%).

In relation to *Firmicutes*, those belonging to the class *Bacilli* were the most abundant both in meconium and 21 d feces (18.8%). However, the diversity of *Firmicutes* was notably higher in 2-years fecal samples where *Clostridium* cluster XIVa (35.2%) and *Clostridium* cluster IV (27.1%) became the predominant classes (Figure 3).

On a lower taxonomic level, the comparison of the 131 hybridization signals, corresponding to the genus-like bacterial groups (level 2), obtained from the 21 d and 730 d fecal samples showed that 91 phylogenetic groups differed significantly between both types of samples. Among them, 60 phylogenetic groups contributed for, at least, more than 0.1% to the microbial profile of each sample (Table 3). The presence of 10 genus-like groups was significantly decreased in the 2-years fecal samples compared to the 21 d ones. It should be highlighted that most of the genera that were significantly reduced are typically associated to hospital environments, including *Enterobacter aerogenes et rel.*, *Enterococcus et rel.*, *E. coli et rel.*, *Granulicatella et*

rel., *K. pneumoniae et rel.*, *Proteus et rel.*, *Serratia* and *Yersinia et rel.* In contrast, there was a very high increase (≥ 40 times) in the abundance of *Anaerostipes caccae et rel.*, *Bacteroides vulgatus et rel.*, *Coprococcus eutactus et rel.*, *Eubacterium hallii et al.*, *Lactococcus*, *Ruminococcus bromii et rel.*, and *Ruminococcus obeum et rel.* from 21 d to 2-years feces (Table 3).

The Shannon-Weaver diversity indices obtained from meconium, 21 d and 2 years fecal samples were compared with data available on the HITChip database of fecal samples from 2-4-year-old healthy infants and, also, from healthy adults (Figure 4). The microbial diversity increases with age both in preterm and healthy individuals. Diversity indices differed significantly among all the groups, except for (a) the meconium and 21 d samples, and (b) the 2-years samples obtained in this study and the data from 2-4-year-old healthy infants existing in the HITChip database (paired *t*-test; $P = 0.511$ and $P = 0.957$ respectively).

The relationships between the observed differences in the bacterial profiles detected in meconium, 21 d and 2-years feces and several demographic and clinical variables (Tables 1 and 2) were explored with multivariate cluster analysis. Redundancy analysis revealed that, among all variables explored, only the age of the infant had a significant effect on the bacterial community composition at the different sampling times ($P = 0.006$, Monte Carlo Permutation Procedure) (Figure 5). More specifically, the observed distribution could explain 41.4% of the variation in the abundance of 30 bacterial groups (Figure 5). Bacterial groups that were positively associated with increased age included bacteria belonging to the butyrate-producing species such as *Butyrivibrio crossotus*, *Eubacterium rectale*, *Eubacterium hallii* and *Ruminococcus obeum*. In contrast, the groups that were negatively associated with age included potentially pathogenic Gram-negative bacteria typically related to hospital environments, such as *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* and *Yersinia*. The uniform length of all vectors depicted in Figure 5 indicates that the strength of the correlation was similar for all bacterial species. The length of the hospital stay was also found to be associated (although not significantly) with 21 d fecal samples and with specific bacterial groups (most notably the *Proteobacteria* phylum). None of the rest of variables significantly influenced the sample separation (data not shown). (paired *t*-test; $P = 0.511$ and $P = 0.957$ respectively).

V.4.3 Immunological analysis

The concentration of a broad range of immune compounds including cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins was measured in 9 meconium and 9, 15 and 16 fecal samples from the first week, third week and second year of life, respectively. Initially, an exploratory screening was performed in order to detect outliers; this analysis revealed that the 2-years fecal sample from infant 2 was very different from the rest of the sample set in the PCA analysis of immune compounds (data not shown). The medical history from this infant reflected a high incidence of acute otitis media during the first two years of life and, in fact, few days after the collection of this fecal sample, this infant was submitted to an emergency surgery. Therefore, this sample was excluded from the general immunological analysis.

Globally, the values obtained for all these immune factors showed a high interindividual variability in both detection frequencies and concentration. Meconium samples showed lower presence of immunocompounds compared to fecal samples, except for MIP-1 β and GM-CSF (Table 4). Most cytokines related to either innate and acquired immunity were detected in less than 50% of the samples except for IL-1 β in the first and third weeks of life, IL-4 (which detection frequency increased over time), and IL-17 in the third week and after two years from birth. Among the chemokines, MCP-1 (2-years samples) and MIP-1 β (meconium, first and third weeks fecal samples) were also detected in more than 50% of the samples while the hematopoietic factors G-CSF and GM-CSF were detected in a higher number of them (Table 4). All the detection frequencies (except those for IL-6 and IL-13) changed significantly ($P < 0.018$) depending on the sampling time (Table 4). However, only GM-CSF showed a statistically significant difference ($P = 0.002$), with higher levels in meconium and 2-years samples, when the evolution over time of the concentrations of all the immunocompounds was considered (Table 4). Some immunocompounds (IL-1 β , IL-2 and MIP-1 β) showed a decreasing tendency while others (IL-6, IL-12(p70), IFN- γ , TNF- α , MCP-1 and IL-5) tended to increase over time.

The concentrations of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA in meconium and fecal samples taken at 7, 21 and 730 days after birth are shown in Table 5. With the exception of IgA, a high degree of variability and a low frequency of detection were observed for immunoglobulins. Similarly to cytokines, the detection frequencies of all the immunoglobulins changed significantly depending on the sampling time but no statistically-significant differences were found in relation to their concentrations. IgA was the most abundant immunoglobulin in all the tested samples with a significant change ($P = 0.004$) over time. The IgA's concentrations in the first week fecal samples (26.62 mg/g) were approximately 26 times higher than that detected in the meconium ones (1.02 mg/g).

When multiple discriminant analysis (MDA) was applied to all the variables, taking infant's age as the discriminant factor, two derivative functions with an eigenvalue > 1 were obtained. The predictive power of the MDA was 85.42% and the expression of the first derivative function (Function 1) had a canonical correlation factor of 0.9018 that was statistically significant ($P = 0.002$). The standardized coefficients for this function were the following: IL-1b (-0.96), IL-2 (-3.38), IL-4 (1.22), IL-5 (-0.56), IL-6 (-0.48), IL-7 (-1.72), IL-8 (-2.81), IL-10 (-4.56), IL-12(p70) (4.50), IL-13 (-1.10), IL-17 (-5.61), G-CSF (4.38), GM-CSF (-0.67), IFN- γ (4.49), MCP-1 (0.81), MIP-1 β (8.88), TNF- α (1.60), GRO- α (-4.78), IgG₁ (2.13), IgG₂ (-6.37), IgG₃ (-2.71), IgG₄ (-0.50), IgM (0.36), IgA (0.30). In fact, the MDA representation allowed a differential classification of fecal samples according to the infant's age when considering their profile of immune compounds (Figure 6). Furthermore, the centroid of each group of samples (meconium, first week, third week and 2-years feces) was located in a different quadrant of the coordinates delimited by the zero values of the axes (Figure 6).

V.5 DISCUSSION

In this study, the bacterial composition of fecal samples obtained from 2-year-old infants that were born preterm was assessed and compared to that of meconium and third week of life fecal samples obtained from the same infants (Moles et al., 2013). In addition, a wide range of cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins were determined in all the meconium and fecal samples in order to describe their immunological profiles, their changes over time and their potential relationships with bacterial colonization.

The results obtained from meconium and third week fecal samples showed a low diversity of bacterial species and high interindividual variability while the opposite was observed in those taken from the same infants at the age of 2. Globally, the bacterial communities evolved towards an adult-like microbiota, which is the normal evolution of the microbiome of healthy term infants as they age (Palmer et al., 2007). Fecal samples taken 2 years after birth showed a distinctive bacterial composition when compared to that obtained from the same infants when they were 3-week-old. Those genera related with hospital environment, such as *E. coli*, *Klebsiella* or *Serratia*, present in the third week of life seemed to be replaced two years later by genera belonging to *Clostridium* clusters IV and XIVa. The predominance of such genera is a feature of the healthy adult gut microbiome, as a part of a complex microbiota which is characterized by slow turnover, preference for low redox potential and high production of short chain fatty acids (Hao & Lee, 2004).

In this study, bacterial diversity increased with age in agreement with previous works that have reported that the number of OTUs detected in fecal samples increases with age in different human populations (Yatsunenko et al., 2012). The Shannon diversity index of the microbiota present in 2-year-old infants stools was higher to that observed in the 21 d ones, similar to that calculated from the 2-4-year-old healthy infants' HITChip database, and lower to that of healthy adults as deduced using the same database. Remarkable changes occur in the gut colonization pattern throughout the two or three first years of life but, then, the microbiota stabilizes and starts to resemble that of adulthood (Wilks, 2007; Koenig et al., 2011). The results of this study indicates that diversity of the gut microbiota of 2-year-old infants that were born preterm has not reached the attributes of the adult microbiome, yet.

Colonization of the infant gut by lactobacilli and bifidobacteria is often delayed or even absent in the case of antibiotic-treated infants (Gewolb et al., 1999; Bennet et al., 2002; Penders et al., 2006), including preterm neonates (Moles et al., 2013). The results obtained in this study indicate that this may be a long lasting effect of prematurity since, after two years from birth, the relative abundance of lactobacilli and bifidobacteria was still low.

Previous studies focused on the detection and quantification of cytokines, chemokines and immunoglobulins in blood samples from term and preterm infants have shown that there are differences in their immune profiles depending on their gestational age (Blanco-Quiros et al., 2000; Matoba et al., 2009; Lusyati et al., 2013). However, as far as we know, this is the first study where a wide range of immune compounds has been assessed in meconium and feces of preterm infants and followed up when they were 2-year-old. Interestingly, each type of sample (meconium, 7 d, 21 d

and 2-years feces) showed a different immune pattern and, in fact, the MDA analysis performed with all the immune variables exhibited a high predictive power highlighting the differences in the immune profiles among the different sampling times.

In this study, the IgA concentration increased notably from meconium to first week feces. This probably results from the massive arrival of bacteria and other antigens to the gut after birth since microbial gut colonization triggers the production of IgA by the gut-associated lymphoid tissue (GALT) (Suzuki et al., 2007). In addition, lactating mammary glands are part of the secretory immune system, and IgA antibodies in breast milk reflect antigenic stimulation of mucosal-associated lymphoid tissue (Brandtzaeg, 2010). Breast-milk antibodies are, thus, highly targeted against infectious agents and other exogenous antigens in the mother's environment, which are those likely to be encountered by the infant (Mohan et al., 2008). Therefore breastfeeding represents an ingenious immunologic mother-infant integration (Brandtzaeg, 2010; Garofalo, 2010; Tomicic et al., 2010; Castellote et al., 2011). This fact highlights the importance of the availability of own mother's or donor's milk to feed preterm neonates, a population particularly sensitive to infectious and inflammatory diseases. It should be noted that an abnormal gut microbial colonization predisposes the neonatal intestine to inflammation and to a cascade of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines responses (Mai et al., 2013). The ability of IgA to penetrate the gut mucosal surface in conjunction with antigens and, as a consequence, to induce effector immune responses, plays a key role in the maintenance of intestinal microbiota and immune homeostasis (Rogosch et al., 2012).

Work is in progress to characterize the wide collection of bacterial isolates obtained from the biological samples analyzed in this study and, therefore, to elucidate at the strain or clone level if initial colonizers may persist later in life.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the projects CSD2007-00063 (FUN-C-FOOD, Consolider-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), by the project FIS PS09/00040 (Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain) and the unrestricted Spinoza Award to WMdV of the Netherlands Foundation for Scientific Research. We would like to thank all the families that participated in this study.

V.6 REFERENCES

- Bennet, R., Eriksson, M., & Nord, C. (2002) The fecal microflora of 1–3-month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection* **30**: 158-160.
- Blanco-Quiros, A., Arranz, E., Solis, G., Villar, A., Ramos, A., & Coto, D. (2000) Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *Eur J Pediatr* **159**: 420-423.
- Brandtzaeg, P. (2010) The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *J Pediatr*. **156 Suppl 2**: 8-15.
- Castellote, C., Casillas, R., Ramirez-Santana, C., Perez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G. et al. (2011) Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* **141**: 1181-1187.
- Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R., & Indrio, F. (2013) Gastrointestinal function development and microbiota. *Ital J Pediatr* **39**: 1-7.
- Espinosa-Martos, I., Moles, L., Manzano, S., Fernández, L., Montilla, A., Corzo, N., & Ares, S. and Rodríguez, J.M. (2014) Bacteriological, biochemical and immunological properties of colostrum and milk from mothers of extremely preterm infants. *JPGN in press*
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P., & Vigi, V. (2003) Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr Suppl* **91**: 48-55.
- Garofalo, R. (2010) Cytokines in human milk. *J Pediatr* **156**: S36-40.
- Gewolb, I. H., Schwalbe, R. S., Taciak, V. L., Harrison, T. S., & Panigrahi, P. (1999) Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **80**: F167-73.
- Hao, W., & Lee, Y. (2004) Microflora of the gastrointestinal tract. In *Public health microbiology*. Springer, pp. 491-502.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., & Welling, G. W. (2000) Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **30**: 61-67.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., & Picaud, J. C. (2011) Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *J Pediatr* **158**: 390-396.
- Johansson, M. A., Saghalian-Hedengren, S., Haileselassie, Y., Roos, S., Troye-Blomberg, M., Nilsson, C., & Sverremark-Ekstrom, E. (2012) Early-life gut bacteria associate with IL-4-, IL-10- and IFN-gamma production at two years of age. *PLoS One* **7**: e49315.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R. et al. (2011) Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108 Suppl 1**: 4578-4585.

- LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., & Seed, P. C. (2011) Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One* **6**: e27858.
- Lusyati, S., Hulzebos, C. V., Zandvoort, J., Sukandar, H., & Sauer, P. J. (2013) Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *J Neonatal Perinatal Med* **6**: 153-163.
- Mackie, R. I., Sghir, A., & Gaskins, H. R. (1999) Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* **69**: 1035S-1045S.
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H. et al. (2012) Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition* **97**: F456-F462.
- Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P., & Suaud, A. (2006) Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiol Ecol* **57**: 128-138.
- Mai, V., Torrazza, R. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Li, N. et al. (2013) Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PloS one* **8**: e52876.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., & de La Cochetiere, M. F. (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol* **21**: 167-173.
- Matoba, N., Yu, Y., Mestan, K., Pearson, C., Ortiz, K., Porta, N. et al. (2009) Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics* **123**: 1320-1328.
- Mohan, R., Koebnick, C., Schildt, J., Mueller, M., Radke, M., & Blaut, M. (2008) Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatr Res* **64**: 418-422.
- Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W. et al. (2013) Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One* **8**: e66986.
- Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N., & Mai, V. (2010) Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *J Pediatr* **156**: 20-25.
- Murgas Torrazza, R., & Neu, J. (2011) The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* **31 Suppl 1**: S29-34.
- Nubel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997) PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3327-3332.
- O'Toole, P. W., & Claesson, M. J. (2010) Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *Int Dairy J* **20**: 281-291.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007) Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* **5**: e177.

- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I. et al. (2006) Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**: 511-521.
- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., & de Vos, W. M. (2009) Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* **11**: 1736-1751.
- Richter, M., Topf, H. G., Groschl, M., Frohlich, T., Tzschoppe, A., Wenzl, T. G., & Kohler, H. (2010) Influence of gestational age, cesarean section, and type of feeding on fecal human beta-defensin 2 and tumor necrosis factor-alpha. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **51**: 103-105.
- Rogosch, T., Kerzel, S., Hoss, K., Hoersch, G., Zemlin, C., Heckmann, M. et al. (2012) IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection. *J Immunol* **189**: 5449-5456.
- Sharma, R., Young, C., & Neu, J. (2010) Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 305879.
- Sjogren, Y. M., Tomicic, S., Lundberg, A., Bottcher, M. F., Bjorksten, B., Sverremark-Ekstrom, E., & Jenmalm, M. C. (2009) Influence of early gut microbiota on the maturation of childhood mucosal and systemic immune responses. *Clin Exp Allergy* **39**: 1842-1851.
- Suzuki, K., Ha, S. A., Tsuji, M., & Fagarasan, S. (2007) Intestinal IgA synthesis: a primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Semin Immunol* **19**: 127-135.
- Tomicic, S., Johansson, G., Voor, T., Bjorksten, B., Bottcher, M. F., & Jenmalm, M. C. (2010) Breast milk cytokine and IgA composition differ in Estonian and Swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatr Res* **68**: 330-334.
- Wan, A. K., Seow, W. K., Purdie, D. M., Bird, P. S., Walsh, L. J., & Tudehope, D. I. (2003) Immunoglobulins in saliva of preterm and full-term infants. *Oral Microbiol Immunol* **18**: 72-78.
- Westerbeek, E. A., Morch, E., Lafeber, H. N., Fetter, W. P., Twisk, J. W., & Van Elburg, R. M. (2011) Effect of neutral and acidic oligosaccharides on fecal IL-8 and fecal calprotectin in preterm infants. *Pediatr Res* **69**: 255-258.
- Wilks, M. (2007) Bacteria and early human development. *Early Hum Dev* **83**: 165-170.
- Woodmansey, E. J. (2007) Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol* **102**: 1178-1186.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M. et al. (2012) Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* **486**: 222-227.

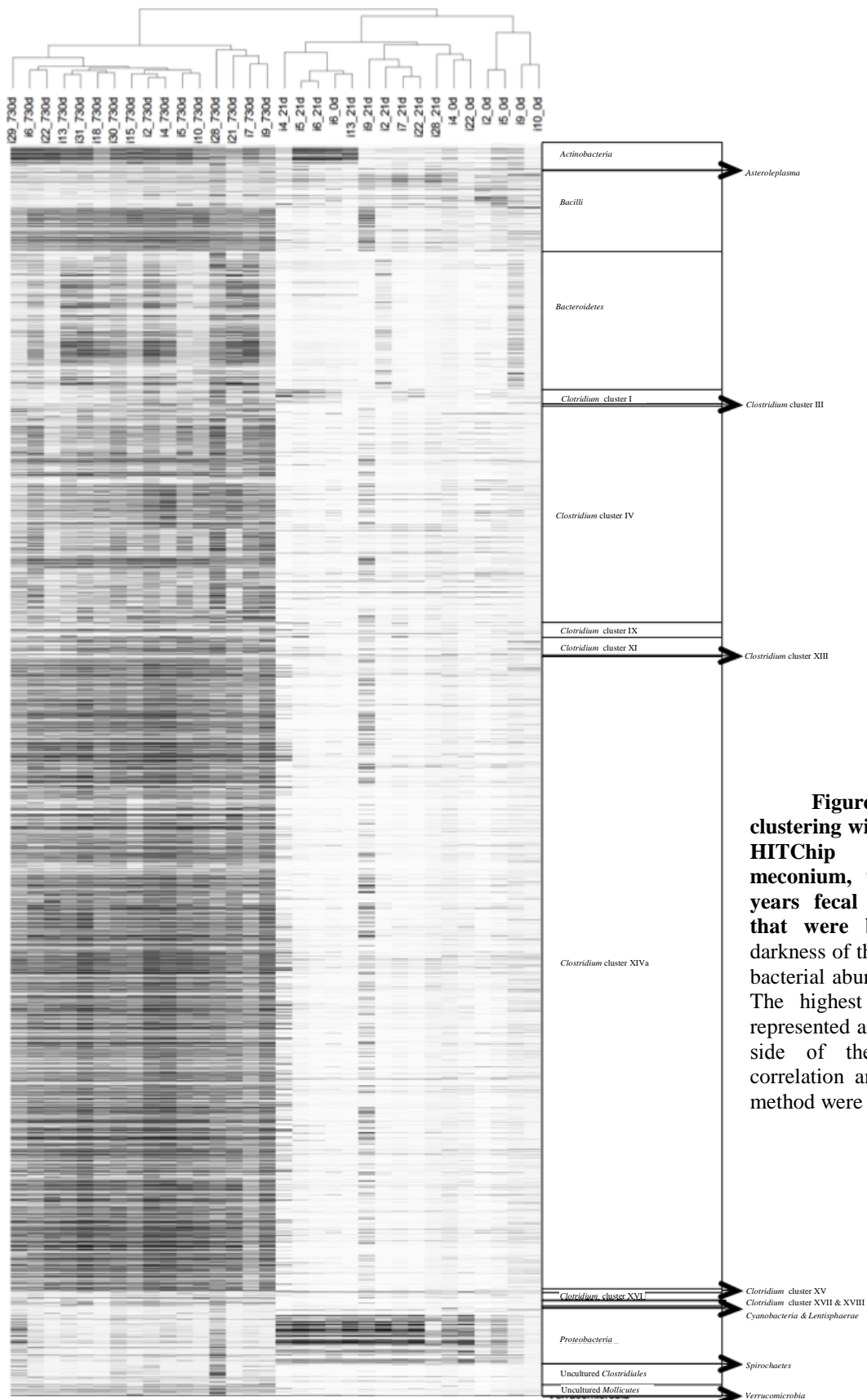


Figure 1. Hierarchical clustering with a heat map of the HITChip profiles from meconium, third week and 2-years fecal samples of infants that were born preterm. The darkness of the lines represents the bacterial abundance in the sample. The highest phylogenetic levels represented are shown on the right side of the figure. Pearson's correlation and Ward's clustering method were used.

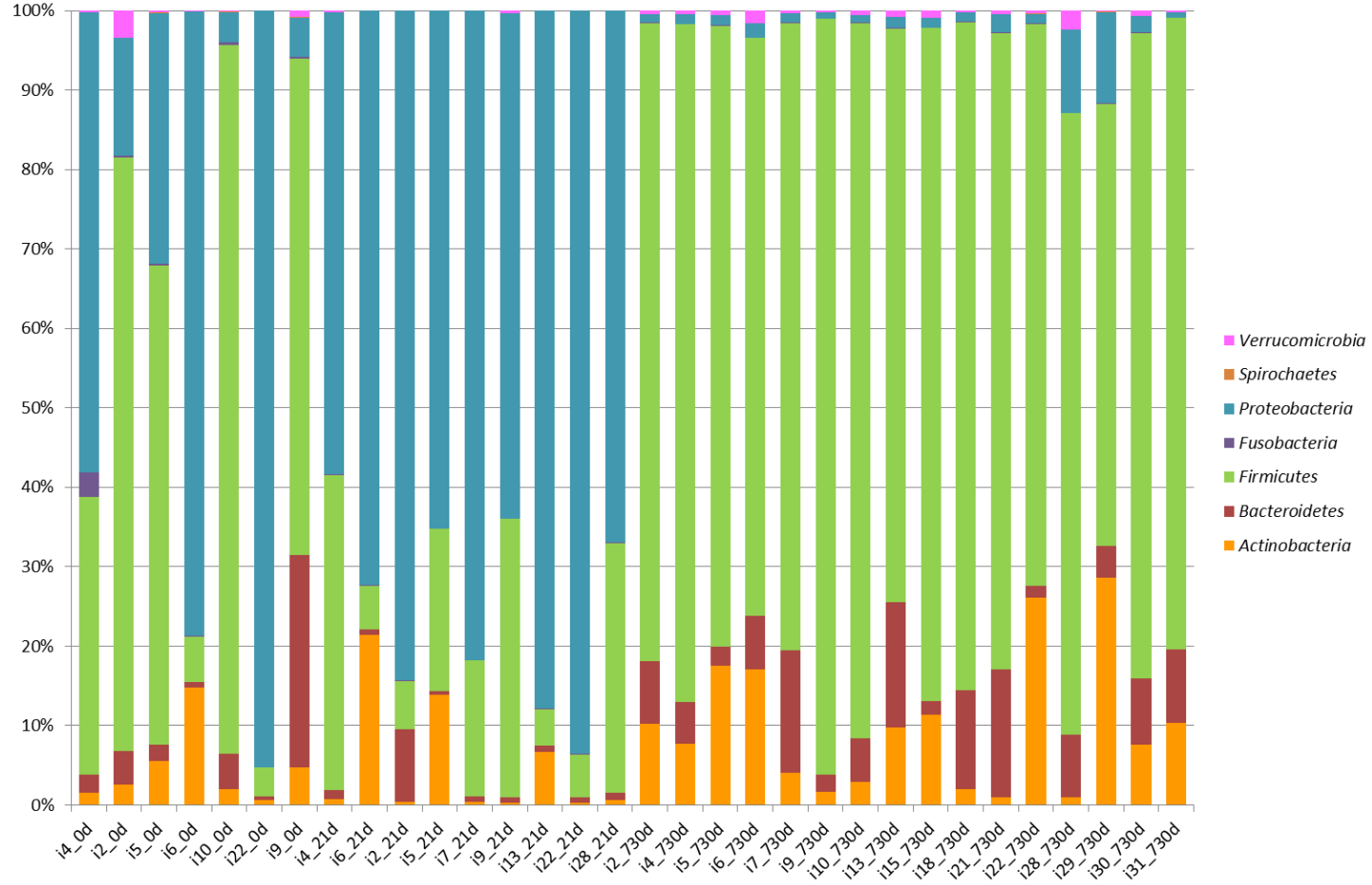


Figure 2. Relative contribution of the phyla detected in meconium (0d), third week (21d) and 2-years (730d) fecal samples of infants that were born preterm, as assessed using the HITChip microarray.

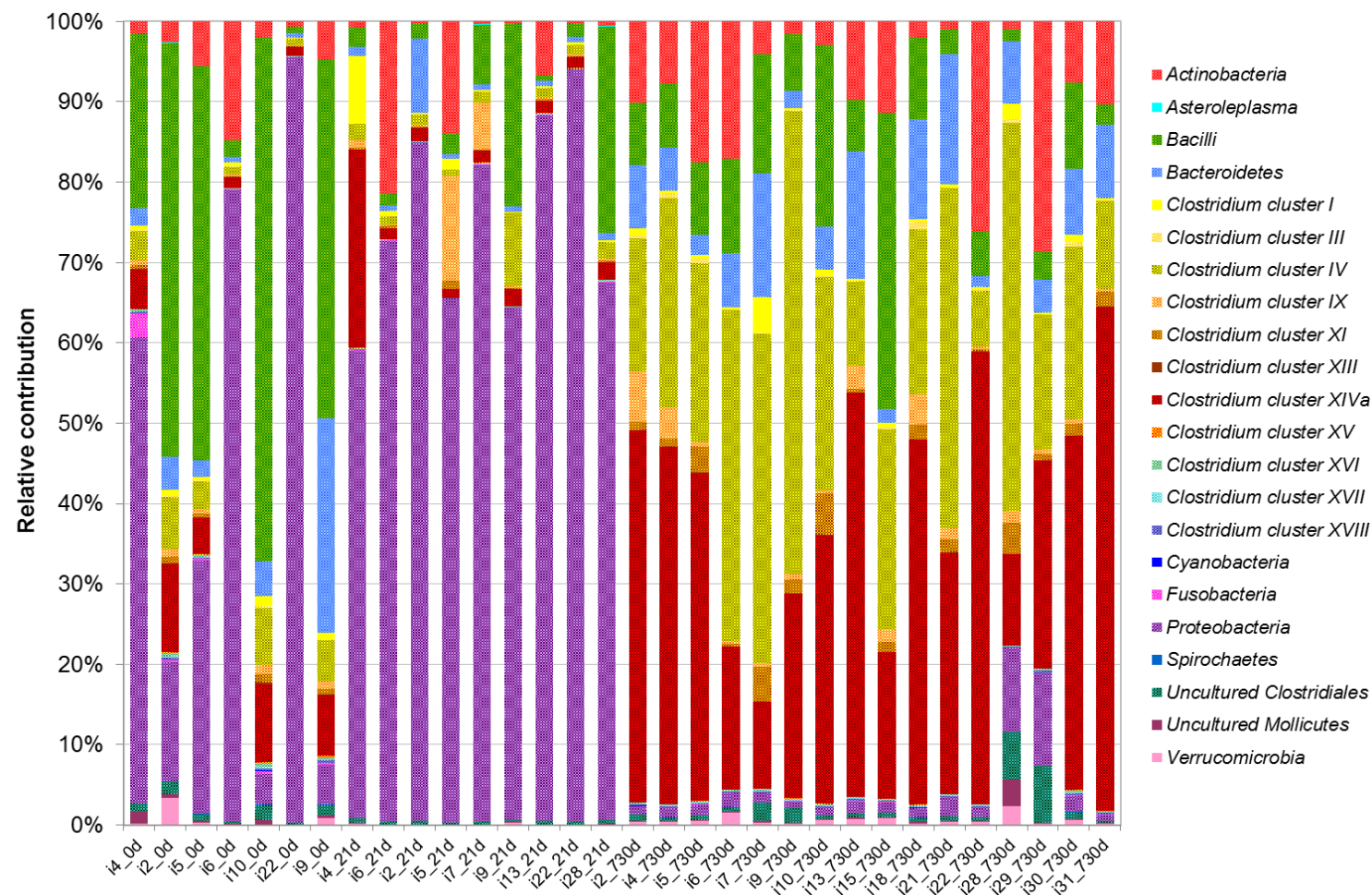


Figure 3. Relative contribution of the phylum/order-like phylogroups to the microbiota of meconium (0d), third week (21d) and 2-years (730d) fecal samples of infants that were born preterm, as assessed using the HITChip microarray. Only phylum/order-like phylogroups that contributed for at least 0.1% to a given profile are shown.

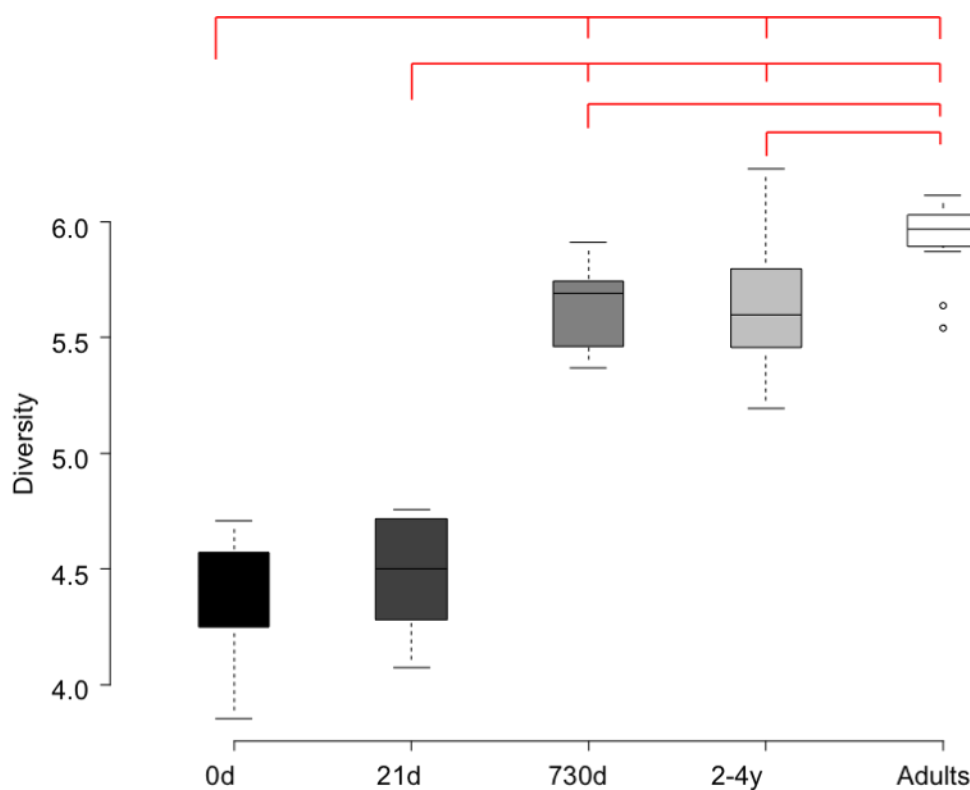


Figure 4. Shannon-Weaver diversity indices of meconium, third week and 2-years fecal samples of infants that were born preterm, as assessed using the HITChip microarray. Boxes at the right and middle represent Shannon-Weaver diversity index obtained in meconium, 21 d and 2 years feces. Boxes on the right represent Shannon-Weaver diversity indices previously obtained with the HITChip in feces from 2 to 4-years-old healthy infants and from healthy adults. The bars on top represent pairs of indices that were found to be statistically different ($P < 0.001$).

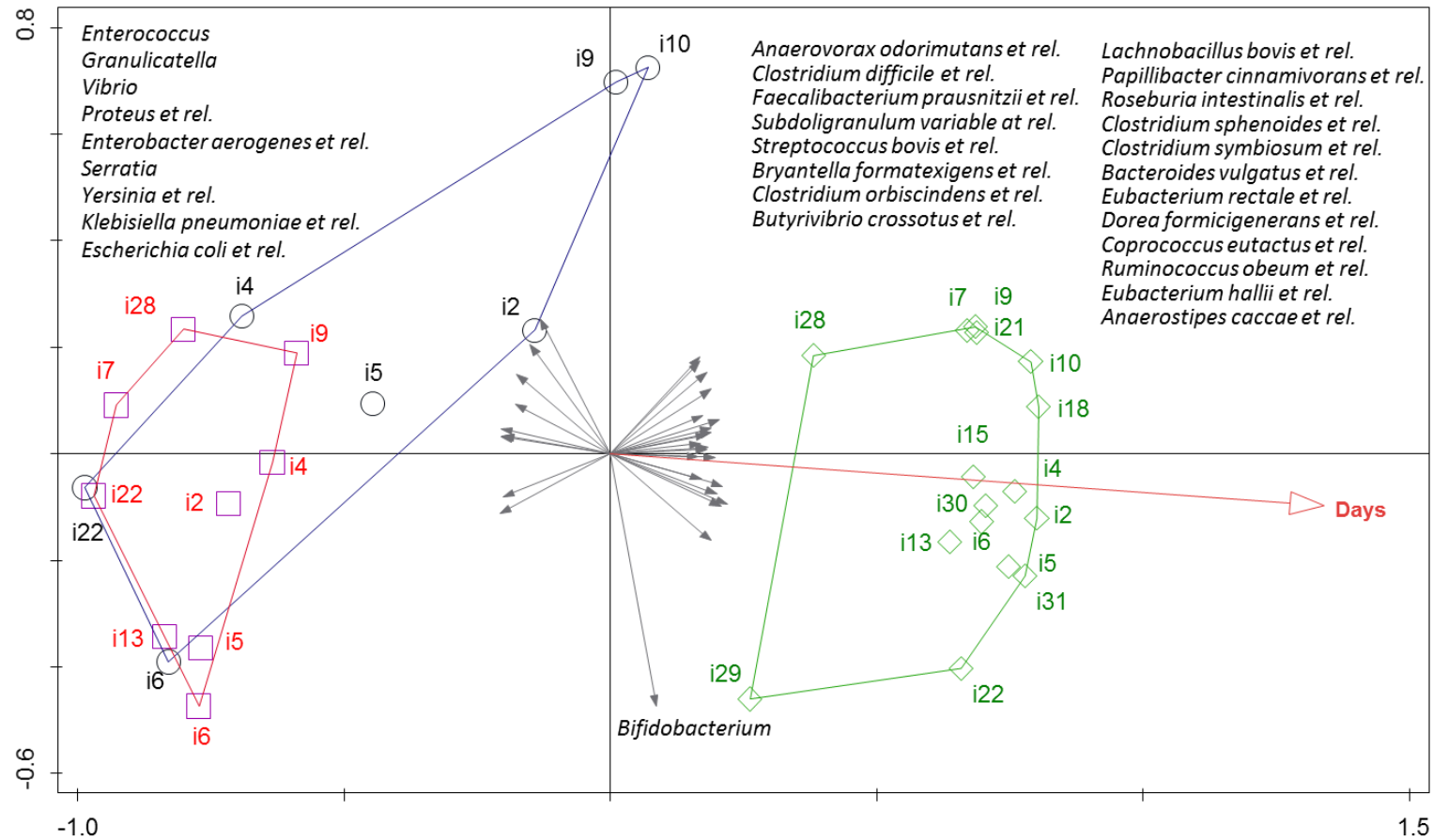


Figure 5. Redundancy analysis of the bacterial composition of meconium (blue circles), third week (red squares) and 2-years (green rhombus) fecal samples of infants that were born preterm. Arabic numbers indicate the different infants. Gray arrows indicate the bacterial groups associated with the different samples. The plotted first and second ordination axes explained 41.4% of the variability in the data set. Age was the only variable that was significantly related to the sample distribution ($P = 0.006$, Monte Carlo Permutation Procedure with forward selection).

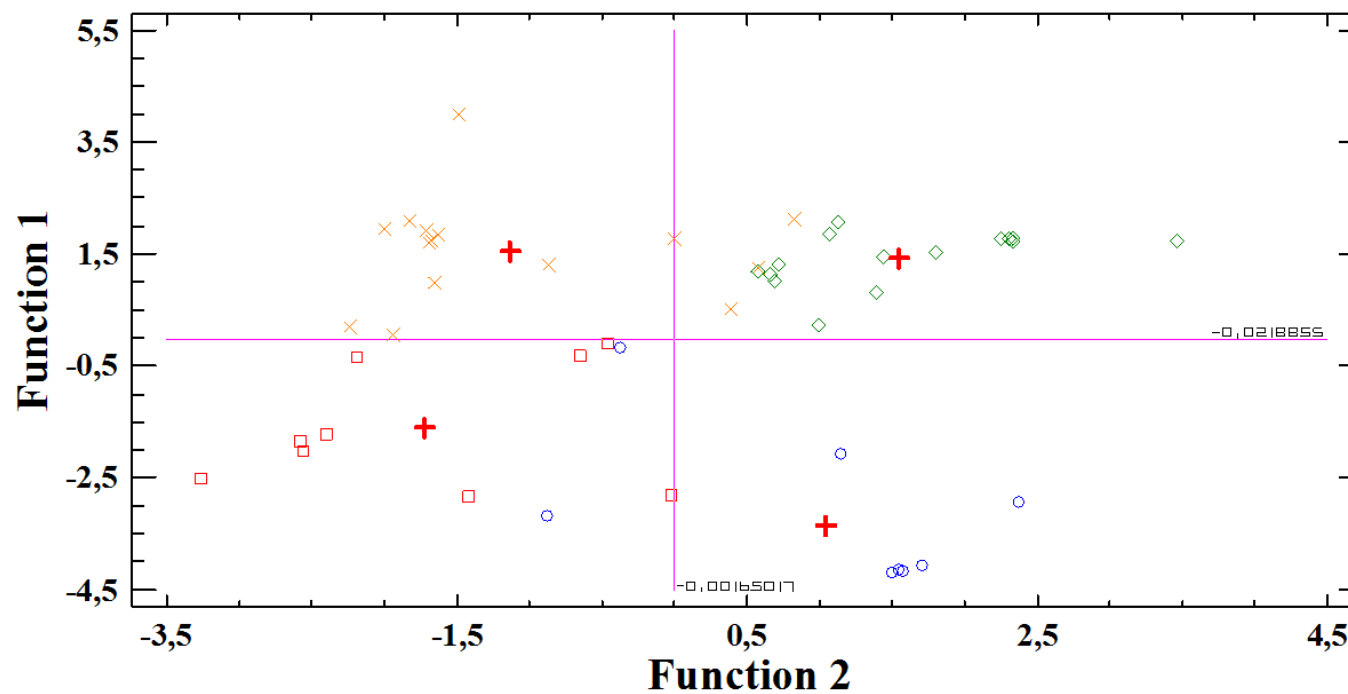


Figure 6. Multiple discriminant analysis (MDA) applied to the immunological data of meconium (blue circles), first week (red squares), third week (orange cross), and 2-years (green rhombus) feces, taking infant's age as the discriminant factor. The red cross represents the mathematical centroid for each age group (meconium, first week, third week, and 2-years fecal samples). The first and second functions, that were plotted as the x and y axes, had a predictive power of 85% and internal axes (pink lines) match the zero values for both functions.

Table 1. Demographic data for the infant cohort.

Infant	Gestational age (week)	Delivery mode	Gender	Birth weight (g)	Sample collection (day of life)[#]
2	30	Cesarean section	Male	1,550	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
4	27	Cesarean section	Female	1,080	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
5	30	Cesarean section	Male	2,030	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
6	30	Vaginal	Male	1,760	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
7	24	Cesarean section	Female	600	<u>0*</u> ; <u>21</u> ; <u>730</u>
9	27	Vaginal	Male	1,540	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
10	26	Cesarean section	Female	790	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
13	32	Vaginal	Female	1,310	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
15	30	Vaginal	Female	1,350	<u>730</u>
18	24	Vaginal	Male	740	7; 21; <u>730</u>
21	28	Cesarean section	Male	1,100	21; <u>730</u>
22	31	Vaginal	Female	1,430	<u>0</u> ; 7; <u>21</u> ; <u>730</u>
28	27	Vaginal	Female	1,040	<u>0</u> ; <u>21</u> ; <u>730</u>
29	29	Cesarean section	Male	680	21; <u>730</u>
30	30	Vaginal	Female	1,370	21; <u>730</u>
31	28	Cesarean section	Female	1,150	21; <u>730</u>

[#] Samples analyzed in this study. Underlined samples correspond to samples analyzed by HITChip: 730 d samples were processed and analyzed in this study, while data from 0 d and 21 d samples were obtained in a previous study. All samples were used for immunological analyses, except one meconium from infant 7 (*) because there was not enough amount of sample for processing.

Table 2. Clinical characteristics of the preterm infants recruited in this study.

Infant	Hospital stay (day)	Antibiotherapy (day)	Mechanical ventilation (day)	Parenteral nutrition (day)	Nasogastric feeding tube (day)
2	42	3	0	5	38
4	60	4	0.5	3	48
5	27	3	2	0	26
6	27	0	0	0	26
7	113	5	9	8	107
9	68	4	2	5	58
10	84	7	0.5	6	70
13	28	3	0	0	21
15	44	3	1	7	38
18	116	27	35	13	112
21	73	7	10	14	62
22	37	3	0	4	35
28	68	7	0	7	62
29	70	15	8	9	60
30	41	4	0	3	40
31	52	3	0	6	47
Mean (95% CI)	58.64 (41.35; 75.93)			4.85 (2.66; 7.05)	52.40 (36.03; 68.82)
Median (IQR)		3.5 (3.0-7.0)	0.25 (0.00-1.75)		

Table 3. Relative counts of genus-like bacterial groups detected in fecal samples collected at 21 days and 2 years after birth from infants that were born preterm using the HITChip microarray^a

Phylum/order	Genus-like phylogenetic group [‡]	21 d	730 d	P-value*	Fold change
		Mean (95% CI)	Mean (95% CI)		
Actinobacteria	<i>Collinsella</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.25 (0.18; 0.32)	0.009	6.77
	<i>Allistipes et rel.</i>	0.09 (0.08; 0.11)	0.38 (0.17; 0.59)	0.009	4.06
	<i>Bacteroides ovatus et rel.</i>	0.06 (0.05; 0.07)	0.38 (0.05; 0.71)	0.009	6.69
	<i>Bacteroides plebeius et rel.</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.12 (0.08; 0.16)	0.009	3.23
	<i>Bacteroides splachnicus et rel.</i>	0.09(0.08; 0.11)	0.26 (0.11; 0.41)	0.016	2.73
Bacteroidetes	<i>Bacteroides stercoris et rel.</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.11 (0.05; 0.16)	0.009	2.97
	<i>Bacteroides vulgatus et rel.</i>	0.08 (0.05; 0.09)	3.12 (1.54; 4.70)	0.009	39.50
	<i>Parabacteroides distasonis et rel.</i>	0.06 (0.05; 0.07)	0.32 (0.16; 0.48)	0.009	5.20
	<i>Prevotella melaninogenica et rel.</i>	0.11 (0.09; 0.13)	0.88 (-0.16; 1.92)	0.033	8.20
	<i>Prevotella oralis et rel.</i>	0.04 (0.03; 0.04)	0.24 (-0.02; 0.50)	0.016	6.55
	<i>Prevotella tannerae et rel.</i>	0.02 (0.02; 0.03)	0.10 (0.07; 0.13)	0.009	4.20
	<i>Tannerella et rel.</i>	0.05 (0.04; 0.06)	0.13 (0.11; 0.16)	0.009	2.63
Bacilli	<i>Enterococcus</i>	3.49 (-1.05; 8.03)	0.10 (0.06; 0.13)	0.009	-36.18
	<i>Granulicatella</i>	1.00 (0.19; 1.80)	0.02 (0.01; 0.02)	0.009	-61.31
	<i>Lactococcus</i>	0.02 (0.01; 0.02)	0.73 (-0.02; 1.48)	0.056	41.05
	<i>Staphylococcus</i>	0.19 (-0.05; 0.43)	0.02 (nd)	0.033	-10.86
	<i>Streptococcus intermedius et rel.</i>	0.04 (0.02; 0.05)	0.15 (0.11; 0.20)	0.033	3.96
Clostridium cluster III	<i>Clostridium stercorarium et rel.</i>	0.03 (0.03; 0.04)	0.28 (0.15; 0.41)	0.009	9.26
Clostridium cluster IV	<i>Clostridium cellulosi et rel.</i>	0.13 (0.11; 16)	3.49 (1.20; 5.79)	0.009	26.48
	<i>Clostridium leptum et rel.</i>	0.18 (0.09; 0.28)	2.16 (0.74; 3.57)	0.009	11.81
	<i>Clostridium orbiscindens et rel.</i>	1.03 (-0.68; 2.73)	5.59 (3.90; 7.29)	0.042	5.44
	<i>Faecalibacterium prausnitzii et rel.</i>	0.17 (0.14; 0.20)	5.02 (1.81; 8.22)	0.009	29.35
	<i>Oscillospira guillermontii et rel.</i>	0.15 (0.13; 0.18)	3.10 (-0.13; 6.32)	0.009	20.04
	<i>Papillibacter cinnamivorans et rel.</i>	0.06 (0.05; 0.07)	0.50 (0.34; 0.66)	0.009	8.56
	<i>Ruminococcus bromii et rel.</i>	0.02 (0.02; 0.03)	1.31 (0.20; 2.43)	0.009	52.65
	<i>Ruminococcus callidus et rel.</i>	0.08 (0.07; 0.09)	0.86 (-0.06; 1.78)	0.009	10.57
	<i>Sporobacter termitidis et rel.</i>	0.16 (0.14; 0.19)	1.89 (0.96; 2.81)	0.009	11.56
	<i>Subdoligranulum variable at rel.</i>	0.11 (0.09; 0.13)	2.98 (1.48; 4.48)	0.009	27.51
Clostridium cluster IX	<i>Dialister</i>	0.05 (0.02; 0.07)	0.75 (-0.03; 1.54)	0.009	16.10
Clostridium cluster XI	<i>Anaerovorax odorimutans et rel.</i>	0.05 (0.04; 0.06)	0.41 (0.27; 0.55)	0.009	7.79
Clostridium cluster XIVa	<i>Anaerostipes caccae et rel.</i>	0.09 (0.05; 0.12)	3.94 (2.10; 5.77)	0.009	45.14
	<i>Bryantella formatexigens et rel.</i>	0.14 (0.08; 0.21)	0.69 (0.50; 0.89)	0.009	4.82
	<i>Butyrivibrio crossotus et rel.</i>	0.16 (0.09; 0.23)	1.41 (1.14; 1.68)	0.009	8.89
	<i>Clostridium colinum et rel.</i>	0.05 (0.04; 0.06)	0.14 (0.06; 0.23)	0.009	2.77
	<i>Clostridium sphenoides et rel.</i>	0.12 (0.09; 0.14)	0.85 (0.56; 1.14)	0.009	7.38
	<i>Clostridium symbiosum et rel.</i>	0.22 (0.13; 0.32)	1.81 (1.38; 2.24)	0.009	8.09
	<i>Coprococcus eutactus et rel.</i>	0.08 (0.06; 0.09)	4.96 (2.87; 7.04)	0.009	64.93

Table 3 (cont.). Relative counts of genus-like bacterial groups detected in fecal samples collected at 21 days and 2 years after birth from infants that were born preterm using the HITChip microarray^a

Phylum/order	Genus-like phylogenetic group [‡]	21d Mean (95% CI)	730d Mean (95% CI)	P-value*	Fold change
(cont.)	<i>Dorea formicigenerans et rel.</i>	0.16 (0.08; 0.23)	2.63 (1.86; 3.40)	0.009	16.72
	<i>Eubacterium hallii et rel.</i>	0.04 (0.02; 0.06)	2.23 (1.40; 3.05)	0.009	52.41
	<i>Eubacterium rectale et rel.</i>	0.06 (0.04; 0.08)	0.42 (0.26; 0.58)	0.009	7.09
	<i>Clostridium cluster XIVa</i> <i>Eubacterium ventriosum et rel.</i>	0.05 (0.02; 0.07)	0.28 (0.13; 0.42)	0.009	6.00
	<i>Lachnobacillus bovis et rel.</i>	0.07 (0.05; 0.07)	0.31 (0.26; 0.36)	0.009	4.43
	<i>Lachnospira pectinoschiza et rel.</i>	0.10 (0.07; 0.13)	0.40 (0.28; 0.53)	0.009	4.08
	<i>Roseburia intestinalis et rel.</i>	0.03 (0.01; 0.05)	0.24 (0.15; 0.34)	0.009	7.86
	<i>Ruminococcus lactaris et rel.</i>	0.03 (0.02; 0.03)	0.42 (-0.18; 1.02)	0.009	16.30
	<i>Ruminococcus obeum et rel.</i>	0.26 (0.21; 0.31)	11.42 (8.18; 14.66)	0.009	43.96
Uncultured <i>Clostridiales</i>	Uncultured <i>Clostridiales I</i>	0.17 (0.14; 0.20)	1.11 (0.12; 2.10)	0.009	6.48
	Uncultured <i>Clostridiales II</i>	0.18 (0.16; 0.21)	0.36 (0.21; 0.51)	0.009	1.97
Uncultured <i>Mollicutes</i>	Uncultured <i>Mollicutes</i>	0.08 (0.07; 0.10)	0.32 (-0.07; 0.70)	0.022	3.94
<i>Proteobacteria</i>	<i>Burkholderia</i>	0.01 (nd)	0.10 (-0.04; 0.24)	0.016	10.98
	<i>Enterobacter aerogenes et rel.</i>	14.82 (8.07; 21.57)	0.21 (0.10; 0.32)	0.009	-69.90
	<i>Escherichia coli et rel.</i>	37.06 (24.37; 49.76)	0.82 (-0.25; 1.88)	0.009	-45.41
	<i>Klebsiella pneumoniae et rel.</i>	15.75 (10.18; 21.32)	0.11 (0.05; 0.18)	0.009	-138.34
	<i>Oxalobacter formigenes et rel.</i>	0.02 (0.02; 0.03)	0.17 (0.02; 0.32)	0.009	7.35
	<i>Proteus et rel.</i>	0.29 (0.17; 0.42)	0.09 (0.05; 0.12)	0.009	-3.46
	<i>Serratia</i>	5.18 (1.88; 8.49)	0.15 (-0.04; 0.33)	0.009	-35.00
	<i>Sutterella wadsworthia et rel.</i>	0.08 (0.07; 0.10)	0.23 (0.07; 0.39)	0.009	2.79
	<i>Vibrio</i>	0.11 (0.08; 0.15)	0.04 (0.03; 0.04)	0.009	-2.94
	<i>Yersinia et rel.</i>	1.16 (0.63; 1.68)	0.04 (0.03; 0.04)	0.009	-31.05
<i>Verrucomicrobia</i>	<i>Akkermansia</i>	0.06 (0.00; 0.13)	0.62 (0.34; 0.91)	0.016	9.64

^a Relative counts (log-transformed hybridization signals) are expressed as the mean and 95% confidence interval.

[‡] The genus-like phylogenetic groups shown contributed, at least, 0.1% to the microbial profile of a given sample.

* *t*-tests were used to evaluate differences in the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time.

Table 4. Detection and concentrations of cytokines in meconium (0 d) and fecal samples collected at 7, 21, 730 days of life of preterm infants.

	0 d (N = 9)		7 d (N = 9)		21 d (N = 15)		730 d (N = 15)		P-value [#]	P-value [¥]
	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)		
Innate immunity										
IL-1 β	2 (22.22)	1.24 (0.68-1.80)	7 (77.78)	0.13 (0.05-0.30)	13 (86.67)	0.05 (0.03-0.38)	0	-	0.000	0.520
IL-6	1 (11.11)	0.03	2 (22.22)	0.02 (0.02-0.03)	3 (20.00)	0.05 (0.05-0.71)	4 (26.67)	0.3 (0.15-0.47)	0.094	0.255
IL-12p70	1 (11.11)	0.06	2 (22.22)	0.11 (0.08-0.15)	4 (26.67)	0.07 (0.05-0.12)	4 (26.67)	0.84 (0.28-1.38)	0.018	0.601
IFN- γ *	0	-	0	-	1 (6.67)	3.27	3 (20.00)	9.27 (-7.44; 25.98)	0.000	0.521
TNF- α	1 (11.11)	0.14	2 (22.22)	0.15 (0.13-0.17)	5 (33.33)	0.18 (0.10-0.25)	3 (20.00)	0.27 (0.17-0.43)	0.002	0.934
Acquired immunity										
IL-2	1 (11.11)	0.92	1 (11.11)	0.09	2 (13.33)	0.04 (0.03-0.05)	4 (26.67)	0.04 (0.02-0.15)	0.003	0.373
IL-4	4 (44.44)	0.01 (0.00-0.01)	6 (66.67)	0.01 (0.00-0.01)	11 (73.33)	0.01 (0.00-0.01)	15 (100.00)	0.01 (0.00-0.01)	0.000	0.292
IL-10	0	-	1 (11.11)	0.03	1 (6.67)	0.04	4 (26.67)	0.03 (0.02-0.23)	0.000	0.675
IL-13*	1 (11.11)	0.03	1 (11.11)	0.05	2 (13.33)	0.08 (-0.10; 0.26)	1 (6.67)	0.05	0.568	0.571
IL-17	4 (44.44)	3.09 (2.32-3.31)	2 (22.22)	0.08 (0.05-0.12)	9 (60.00)	0.07 (0.03-0.19)	12 (80.00)	0.08 (0.04-0.06)	0.000	0.122
Chemokines										
IL-8*	4 (44.44)	0.07 (-0.08; 0.21)	1 (11.11)	0.05	3 (20.00)	0.09 (-0.02; 0.20)	0	-	0.000	
MCP-1	3 (33.33)	0.03 (0.02-0.03)	1 (11.11)	0.03	4 (26.67)	0.05 (0.03-0.06)	9 (60.00)	0.19 (0.06-0.88)	0.000	0.080
MIP-1 β	6 (66.67)	0.62 (0.05-1.78)	6 (66.67)	0.05 (0.04-0.16)	8 (53.33)	0.07 (0.02-0.10)	2 (13.33)	0.05 (0.04-0.07)	0.000	0.639
GRO- α	3 (33.33)	0.18 (0.16-8.28)	0 (0.00)	-	6 (40.00)	0.16 (0.11-0.19)	3 (20.00)	0.14 (0.13-0.22)	0.000	0.537
Hematopoietic factors										
IL-5*	0	-	0	-	1 (6.67)	0.03	5 (33.33)	0.25(0.03; 0.47)	0.000	0.322
IL-7	1 (11.11)	0.03	1 (11.11)	0.04	3 (20.00)	0.03 (0.02-0.05)	0	-	0.000	0.766
G-CSF	4 (44.44)	1.64 (0.34-4.29)	6 (66.67)	0.06 (0.04-0.17)	12 (80.00)	0.28 (0.15-0.55)	12 (80.00)	0.14 (0.11-0.46)	0.000	0.220
GM-CSF	9 (100.00)	0.59 ^a (0.28-55.03)	7 (77.78)	0.23 ^{ab} (0.12-0.40)	15 (100.00)	0.23 ^{ab} (0.18-0.26)	15 (100.00)	0.67 ^{ac} (0.62-0.87)	0.000	0.002

IL: interleukin; IFN: interferon; G-CSF: granulocyte-colony-stimulating factor; GM-CSF: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; MCP: macrophage/monocyte chemoattractant protein; MIP: macrophage inflammatory protein; TNF: tumor necrosis factor.

Concentrations (ng/g feces) were expressed as median and interquartile range (IQR).

^an (%): number of samples where the parameter was detected (relative frequency of detection).

[#]Chi-squared tests were used to evaluate differences in expression frequencies of the analyzed parameters.

[¥]One way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to evaluate differences in concentration across time. Different superscript letters show which medians were different within groups.

*These data sets were normally distributed and concentrations were expressed as mean and 95% CI.

Table 5. Detection and concentrations of immunoglobulins (Ig) in meconium (0 d) and fecal samples collected at 7, 21, 730 days of life of preterm infants.

	0 d (N = 9)		7 d (N = 9)		21 d (N = 15)		730 d (N = 15)		<i>P</i> -value [#]	<i>P</i> -value [¥]
	n (%) ^a	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)	n (%)	Median (IQR)		
IgG1	4 (44.44)	0.03 (0.02-0.06)	2 (22.22)	0.34 (0.18-0.50)	3 (20.00)	0.32 (0.17-0.76)	1 (6.67)	0.06	0.000	0.621
IgG2	6 (66.67)	1.54 (0.84-3.39)	7 (77.78)	0.99 (0.84-1.19)	3 (20.00)	0.35 (0.27-0.62)	2 (13.33)	0.34 (0.24-0.44)	0.000	0.062
IgG3*	0	-	1 (11.11)	0.01	0	-	2 (13.33)	0.01 (-0.01; 0.03)	0.000	0.326
IgG4*	2 (22.22)	0.00 (-0.01; 0.01)	3 (33.33)	0.01 (-0.00; 0.02)	1 (6.67)	0.00	1 (6.67)	0.01	0.000	0.510
IgM	1 (2.08)	0.55	6 (12.50)	2.27 (0.53-5.14)	11 (22.92)	0.54 (0.33-0.88)	1 (6.67)	0.08	0.000	0.368
IgA	5 (55.56)	1.02 ^a (0.48-67.45)	8 (88.89)	26.62 ^{ab} (10.42-58.88)	15 (100.00)	6.24 ^{ab} (3.69-26.13)	13 (86.67)	1.13 ^{ac} (0.81-3.18)	0.000	0.004

Concentrations (mg/g feces) were expressed as median and interquartile range (IQR).

^an (%): number of samples where the parameter was detected (relative frequency of detection).

[#]Chi-squared tests were used to evaluate differences in expression frequencies of the analyzed parameters.

[¥]One way ANOVA or Kruskal-Wallis tests were used to evaluate differences in concentration across time. Different superscript letters show which medians were different within groups.

* These data sets were normally distributed and concentrations were expressed as mean and 95% CI.

**VI. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLADOS DE
KLEBSIELLA SPP. PROCEDENTES DE CASOS
HOSPITALARIOS Y MECONIO, HECES Y LECHE
MATERNA DE HUÉSPEDES SANOS**



**VI. MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *KLEBSIELLA* SPP
STRAINS ISOLATED FROM CLINICAL CASES AND FROM
MECONIUM, FECES AND BREAST MILK OF HEALTHY HOSTS**

Manuscrito enviado a *BMC Microbiology*

VI.1 ABSTRACT

Bacteria of the genus *Klebsiella* are opportunistic pathogens responsible for nosocomial infections that are increasingly resistant to antibiotics. Thus, ESBL-producing *K. pneumoniae* has been associated to outbreaks in neonatal intensive care units. However, some studies have demonstrated that *Klebsiella* spp. form part of the human milk microbiota, which represents a supply of commensal, mutualistic and potentially probiotic bacteria to the infant gut. Here the identification and characterization of *Klebsiella* spp. from breast milk, faeces and meconium from healthy newborns and from clinical samples are described.

The analysis of a 454-bp sequence of the *rpoB* gene, together with a phylogenetic analysis, was useful to identify *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. variicola* and *R. planticola*. Genotyping of isolates by PFGE revealed a high genetic diversity. No differences were found with respect to the presence of *magA*, *rmpA*, *wabG*, *uge*, *kfu* y *fimH* genes encoding potential virulence factors of *K. pneumoniae*, genes encoding the siderophores enterobactin, aerobactin and yersibactin, or the production of siderophores and biofilms. However, the antibiotic susceptibility profiles of the *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *K. variicola* isolates from a nosocomial outbreak were ESBLs producers and exhibited more resistance. Molecular analysis determined the presence of CTX-M-15 genes in all *K. pneumoniae* isolates. PFGE analysis of ESBLs producers, which were isolated from the neonatology service over a six-month period revealed the existence of a polyclonal outbreak. The CTX-M-15 ESBLs *K. pneumoniae* strains harbored a plasmid of 75 kb that was also present in the ESBLs producer *K. variicola*. In addition, we found two different bacteriocin-producing *K. pneumoniae* strains with antimicrobial activity against *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *K. variicola*.

In terms of virulence, *Klebsiella* spp. isolates from breast milk of healthy women, feces of their healthy newborns, community acquired infections or nosocomial outbreaks were indistinguishable. The only difference observed was the antibiotic susceptibility profiles showed by those strains isolated from a nosocomial outbreak, being ESBLs producers and harbouring CTX-M-15 genes.

Keywords: *Klebsiella* spp., nosocomial outbreak, breast milk, virulence, *rpoB*, preterm

VI.2 BACKGROUND

Klebsiella spp. are ubiquitous in nature and can be found in environmental samples, such as surface water, sewage, soil, and plants, but also colonizing the mucosal surfaces of healthy mammals (Podschum and Ullmann, 1998). In humans, *Klebsiella pneumoniae* is one of the most important infectious agent in hospital environments, being responsible for urinary tract infections, pneumonia or neonatal septicemia in newborns (Podschum and Ullmann, 1998; Kang et al., 2006). It has been estimated that *Klebsiella* cause 3-8% of all nosocomial bacterial infections, being *K. pneumoniae* responsible for 14% of Gram-negative infections in hospital intensive care units (ICUs) (Schaberg et al., 1991; Podschun and Ullmann, 1998; Lockhart et al., 2007). On the other hand, some studies have demonstrated that *Klebsiella* spp. could be part of the normal human milk microbiota which represents a supply of commensal, mutualistic and potentially probiotic inoculum from the mother to the infant gut (Martín et al., 2003; Heikkilä and Saris, 2003; Jiménez et al., 2008a, Jiménez et al., 2008b). Culture-dependent and -independent techniques have revealed the dominance of staphylococci, streptococci, lactic acid bacteria and bifidobacteria in this biological fluid, and their potential role in the infant gut colonization (Martín et al., 2007a; Martín et al., 2007b, Martín et al., 2009). Although more infrequently, *Klebsiella* spp. has been isolated from fresh breast milk of healthy women as well as from meconium and feces of healthy term infants (Jiménez et al., 2008b).

The major species of this genus is *K. pneumoniae*, followed by *Klebsiella oxytoca*. Both are considered as opportunistic pathogens with major relevance in immunocompromised situations and patients suffering from severe underlying diseases. Isolates producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) are of particular concern as their infections are associated to relatively high mortality rates due to treatment failure (Paterson and Bonomo, 2005; Turner 2005; Chong et al., 2011). In neonatal ICUs (NICUs), *Klebsiella* nosocomial infections are especially problematic, especially in preterm neonates (Rettedal et al., 2013; Fabbri et al., 2013), causing neonatal sepsis in both early- and late-onset infections (Gotoff, 1992).

Up to the present, several virulence factors have been associated with *Klebsiella* pathogenesis, including the production of an antiphagocytic capsule as well as lipopolysaccharide (LPS) that contributes to serum resistance, siderophores to capture host iron, and fimbrial and non-fimbrial adhesines that allow the bacteria to bind to host structures (Willians and Tomas, 1990; Regue et al., 2001; Chou et al., 2004; Ma et al., 2005; Brisse et al., 2009). In addition, some studies suggest that ability of biofilm formation may also be an important virulence factor for *K. pneumoniae* since it may enhance the resistance to antibiotic therapies and to host defense mechanisms (Jagnow and Clegg, 2003; Boddicker et al., 2006; Fux et al., 2005).

The aim of this study was to identify and characterize a set of *Klebsiella* spp. isolates obtained from breast milk, meconium and infant feces obtained from healthy asymptomatic hosts and compare it with invasive isolates obtained from blood cultures of adults and isolates from a NICU.

VI.3 METHODS

VI.3.1 Bacterial strains and growth conditions

A total of 57 *Klebsiella* spp. isolates were included in this study (Table 1). These isolates were obtained in the period 2005-2007 from different origins: i) 20 commensal isolates from human breast milk (n=5), meconium (n=1) and infant feces (n=14) of healthy individuals from the bacterial collection of the Complutense University of Madrid (Spain); ii) 10 clinical isolates from the NICU of the Hospital 12 de Octubre from blood (n=2), catheter (n=1), environmental surfaces (n=2), and fecal samples/intestinal content of newborns admitted at the NICU (n=5); and finally iii) 27 bacteraemic isolates from adult patients at the Hospital Ramón y Cajal. The Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos of Madrid (Spain) approved the study protocol (reference 10/017-E). In the frame of such protocol, samples used to isolate the bacterial strains were obtained after informed written consent of each person or, when required, the infants' legal guardians. All strains were routinely grown in Brain Heart Infusion (BHI; Oxoid, Basingstoke, UK) broth, BHI solid medium (containing 1.5% w/v agar) or in MacConkey agar medium (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) at 37°C. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* DSMZ30104^T, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* DSMZ16231^T, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* DSMZ16358^T, *K. pneumoniae* CECT 142^T, *K. pneumoniae* CECT 517^T and *K. oxytoca* CECT 860^T were used as reference strains.

VI.3.2 Identification of isolates

Isolates were identified by PCR sequencing of a 454 bp fragment of the *rpoB* gene amplified with the primer pair KrpoB-for and KrpoB-rev (Table 2). PCR conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, and a final extension of 72°C for 5 min. The amplicons were purified using the Nucleospin Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Genomics Unit of the Universidad Complutense de Madrid, Spain. The resulting sequences were used to search against sequences deposited in the EMBL database using BLASTn algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>98%). Identification of the *Klebsiella oxytoca* isolates was confirmed by a species-specific PCR with the pair primer peH-A-for and peH-D-rev (Kovtunovych et al., 2003) (Table 2).

Some biochemical tests were assessed to confirm the identification of isolates, such as the reaction by ornithine decarboxylase test, which is negative in the case of *Raoultella* spp.

The *rpoB* gene sequences obtained were deposited in the GenBank database, under the accession numbers KJ499842 to KJ499903.

VI.3.3 Plasmid DNA isolation

Small plasmids were extracted from 16 h BHI broth cultures with the “QIAprep Spin Miniprep Kit” (QIAGEN) as recommended by the manufacturer and visualized in a 1% agarose gel using conventional electrophoresis (90 V for 90 min) using Supercoiled ladder (1-16 kb) (Invitrogen, Paisley, UK). Large plasmids (>16kb) were extracted using PFGE-S1 nuclease digestion (Takara Bio Inc, Shiga, Japan) with the following conditions: 14°C, 6 V/cm² and 5-25 s for 3 h followed by 30-45 for 12 h. Plasmid size was calculated using the Phoretix 5.0 software and both Lambda Ladder PFG Marker (48,5-1000,18 Kb) and Low Range PFG Marker (0,13-194 Kb) (New England Biolabs, Inc.) as references.

VI.3.4 Genetic relatedness and phylogenetic analysis

Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was done according to the method described by Kaufmann et al. (1998). Chromosomal DNA of each isolate was digested with 30 U of *Xba*I (TaKaRa Bio Inc, Shiga, Japan). Electrophoresis was carried out in a CHEF DR II apparatus (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) with the following conditions: 14°C, 6 V/cm² and 10-40 s for 24 h. A dendrogram representing the relationship was constructed using the Phoretix 5.0 software based on the Dice coefficient (Figure 1). Ascription of the isolates to one of the three *K. pneumoniae* phylogenetic groups (KpI, KpII and KpIII) was obtained by PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the *gyrA* gene as reported by Brisse et al. (2004) (Figure 1).

For phylogenetic analysis, the obtained *rpoB* sequences (454 bp) were aligned using the Clustal W method (Thompson et al., 1994) with the MEGA5 (Version 5.2.1) software (Tamura et al., 2007). Phylogenetic trees were constructed based on the neighbour-joining method with the Jukes-Cantor parameter model (Saitou and Nei, 1987) (Figure 2). Bootstrapping analysis (1,000 replicates) was done to study the stability of the groupings. The *rpoB* sequences of the following strains were obtained from the GenBank database and included in the phylogenetic analysis: *Raoultella ornithinolytica* ATCC 31898^T (AF129447), *K. variicola* F2R9^T (AY367356), *Raoultella planticola* ATCC 33531^T (AF129449) and *Staphylococcus sciuri* subsp. *carnaticus* ATCC 700058^T (DQ120748). To discriminate phylogenetic groups within the *K. pneumoniae*, *K. variicola* and *K. oxytoca* strains, other trees including *rpoB* sequences analyzed by other authors (Fevre et al., 2005; Alves et al., 2006) were constructed (data not shown).

VI.3.5 Antimicrobial susceptibility testing and screening for extended-spectrum beta-lactamase

Minimal inhibitory concentrations (MICs) to several antibiotics were evaluated by a microdilution method using the Sensititre EMIZA 9EF (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, EEUU) plates following the manufacturer's instructions (Table 3). Production of ESBLs was tested by the double-disk synergy test (Jarlier et al., 1998) containing ceftazidime/ceftazidime plus clavulanate or cefotaxime/cefotaxime plus

clavulanate (Table 4). The presence of CTX-M β -lactamase-encoding genes (*bla*_{CTX-M}) was evaluated by multiplex PCR (Figure 1). Sub-grouping of *bla*_{CTX-M} ESBL genes was performed using primers (Table 2) and conditions described by Woodford et al. (2006). P1 and P2b primers (Table 2) were used to amplify and sequence *bla*_{CTX-M-1} group genes (Wang et al., 2003). The nucleotide sequences obtained were compared with those available in the NCBI and Lahey databases.

VI.3.6 Virulence determinants

Presence of *magA*, *rpmA*, *wabG*, *uge*, *kfu* and *fimH* genes encoding potential virulence factors of *K. pneumoniae* were determined by PCR using specific primers (Table 2). PCR conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 60°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 5 min. Parallel, a novel multiplex PCR was designed to detect genes associated to biosynthesis or acting as receptors of the siderophores aerobactin (*iutA*, *iucB*), enterobactin (*fepA*, *fepC*), and yersibactin (*fyuA*, *ybtT*). For this purpose, six primer pairs (*iutA*-F/*iutA*-R, *iucB*-F/*iucB*-R, *fepA*-F/*fepA*-R, *fepC*-F/*fepC*-R, *FyuA*-F/*FyuA*-R and *YbtT*-F/*YbtT*-R; Table 2) were designed, which resulted in the amplification of 580, 692, 897, 280, 828 and 451 bp DNA fragments, respectively. PCR conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 4 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 62°C for 30 s, 72°C for 1 min, and a final extension of 72°C for 5 min.

VI.3.7 Biofilm and siderophores assays

The biofilm formation ability of the isolates was analyzed in polyvinylchloride plastic (PVC) microtitre plates according to the protocol of Fletcher (1977). Quantification of biofilm formation was done according to the method of O'Toole and Kolter (1998).

Siderophore production in cell-free supernatants was quantified by the method of Schwyn and Neiland (1987) (Figure 1).

VI.3.8 Antimicrobial activity of the isolates

The ability to inhibit other strains was tested both on solid and in broth medium, according to the direct (Tagg et al., 1976) and the “spot-on-the-lawn” methods (Harris et al, 1999), respectively (Figure 1). Immunity of *K. pneumoniae* MV91-1 and Kp5 and *K. oxytoca* K12-5 to microcins ColK, L, and HyM produced by *Escherichia coli* K12 (*pColK-K235*), *E. coli* K12 (*pL102*) and *E. coli* Nissle 1917, respectively, was also tested. PCR for detection of klebicins C and D genes was carried out by using oligonucleotides KlebC-For/KlebC-rev (Table 2), according to Chavan et al., (2005).

VI.4 RESULTS

VI.4.1 Identification of isolates

The identification of all the isolates at the species level is shown in Table 1. The amplification and partial sequencing of a 454 bp fragment of the *rpoB* gene achieved a great level of identification of the *Klebsiella* isolates. However, the analysis of this sequence did not allow to discriminate between *R. ornithinolytica* of *R. planticola*. In contrast, isolates Ko-1 and Ko10, that were identified as *R. planticola* and *R. planticola/R. ornithinolytica* by *rpoB* sequencing, gave a negative reaction in the ornithine decarboxylase test, indicating that these isolates are *R. planticola* species. The reference strains *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* DSMZ30104^T, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* DSMZ16231^T, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* DSMZ16358^T, *K. pneumoniae* CECT 142^T, *K. pneumoniae* CECT 517^T and *K. oxytoca* CECT 860^T were correctly identified to species level by *rpoB* sequencing. In addition, *K. oxytoca* species-specific PCR gave a positive result only in those strains identified as *K. oxytoca* by *rpoB* sequencing.

VI.4.2 Genetic diversity and phylogenetic analysis

In general, high genetic diversity was detected among 33 *K. pneumoniae* and 20 *K. oxytoca* isolates analyzed. Analysis of PFGE profiles discriminated 28 different pulsotypes among *K. pneumoniae* isolates (Figure 1A) and 18 different band patterns among 20 *K. oxytoca* isolates (Figure 1B).

The resulting relationships derived from the phylogenetic study of the *rpoB* nucleotide sequences are represented in Figure 2. Interestingly, isolates from all origins clustered together indicating the absence of epidemic clones.

According to *gyrA*-based analysis, KpI (32 out 33 *K. pneumoniae* isolates, 96.6%) and KoI (17 out 20 *K. oxytoca* isolates, 85.0%) were the most represented phylogenetic groups, while the other groups were scarcely observed (Figure 1).

In the phylogenetic analysis of the *K. pneumoniae* strains based on the *rpoB* gene (Fig. 2), 30 (94%) *K. pneumoniae* isolates clustered with KpI, 1 (3%) with KpII-A, 1 (3%) with KpII-B, and none with KpIII (Figure 2). In the tree constructed using the sequences of Fevre et al. (2005) and Alves et al. (2006) (results not shown), all isolates analyzed in the present study matched perfectly with clusters KpI, KpIIA or KpIIB. Additionally, the two *K. variicola* isolates identified in this study (K12-3 and MV3-1) clustered in the KpIII group together with *K. variicola* F2R9^T (Figure 2). *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* appeared to be closely related to *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* on the tree (Kp group).

In the phylogenetic analysis of the *K. oxytoca* strains based on the *rpoB* gene (Fig. 2), 17 (85%) *K. oxytoca* isolates clustered with KoI, 1 (5%) isolate with KoII and other 2 isolates (10%) with KoVI. In the tree obtained with the sequences of Fevre et al. (2005) and Alves et al. (2006), all isolates from the present study matched perfectly with clusters KoI, KoII or KoVI. However, none of our *K. oxytoca* isolates were found to belong to clusters KoIII or KoIV.

VI.4.3 Plasmid profiling

A total of 28 (89%) *K. pneumoniae* and 18 (85%) *K. oxytoca* isolates contained plasmids (one to seven plasmids) ranging from 1 to 600 kb (Figure 1). Both *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* contained a major proportion of large (>30 kb) than small plasmids (<30 kb). *R. planticola* Ko1 was the strain with the highest number of plasmids (n=8). Interestingly, six of the seven *K. pneumoniae* isolates harbouring the *bla*_{CTX-M-15} genes shared a plasmid of ca. 75 kb (Figure 1).

VI.4.4 Antimicrobial susceptibility

Low resistance rates were detected for both commensal and bacteraemic isolates, whereas isolates from NICU were multiresistant and ESBL-producers (Table 3). The antibiotic susceptibility profiles of *K. pneumoniae* K12-1, K12-4, K12-6, K12-8, K12-9 and K12-10, *K. oxytoca* K12-5 and K12-7 and *K. variicola* K12-3 indicated that they were producing ESBLs, which was confirmed by the double-disk synergy test. All *K. pneumoniae* isolates with ESBLs-producing phenotype harboured the *bla*_{CTX-M-15} gene.

VI.4.5 Virulence determinants and biofilm formation ability

The *wabG*, *uge* and *kfu* genes were detected in 39%, 22% and 22%, respectively, of the *K. pneumoniae* strains (Table 4). All *K. pneumoniae* isolates presented the *fimH* gene whereas the *rmpA* gene was not detected (Table 4). In contrast, none of the *K. oxytoca* strains contained any of the virulence genes studied. A novel multiplex PCR targeting biosynthesis and receptor genes of the siderophores aerobactin, enterobactin and yersinibactin showed that, among the *K. pneumoniae* strains, 48.5% presented the enterobactin-related genes, 6% the yersiniabactin-related genes, and 9% the genes of both siderophores (Table 4; Figure 1). None of the *K. oxytoca* strains were positive for any of the siderophore-related genes studied. The ability to form biofilms was demonstrated in 13% of the *K. pneumoniae* whereas none *K. oxytoca* strain was able to produce biofilms on PVC plates (Figure 1).

VI.4.6 Antimicrobial activity

Bacteriocinogenic activity was only produced by *K. pneumoniae* MV91-1 and Kp5 (Figure 3) although both isolates displayed different spectrum (Figure 1). The inhibitory activity of both strains was sensitive to proteinase K. *K. pneumoniae* MV91-1 possessed a broader inhibitory spectrum than Kp5, being active against 80% of *K. oxytoca* and 65% of *K. pneumoniae* isolates. In addition, MV91-1 presented antimicrobial activity against *K. variicola* K12-3 and *R. planticola* Ko10. In contrast, *K. pneumoniae* Kp5 displayed a narrower inhibitory spectrum, being active against 30% of *K. oxytoca* and 45% of *K. pneumoniae* strains (Figure 1).

The microcins-produced by *E. coli* K12 (pColK-K235; microcin ColK), *E. coli* K12 (pL102; microcin H) and *E. coli* Nissle 1917 (microcin M) were unable to inhibit

any of the *Klebsiella* strains tested in this study, whereas the two producers strains *K. pneumoniae* MV91-1 and Kp5 inhibited the three microcin-producers *E. coli* strains. However, in liquid medium neither *K. pneumoniae* MV91-1 nor Kp5 were able to produce the antimicrobial compounds. The addition of mitomycin C, that has been shown to induce the bacteriocin production in *Enterobacteriae* (Baffenmyer et al., 1976), to the producer *Klebsiella* strains was unable to induce the production of antimicrobial compounds.

VI.5 DISCUSSION

The correct identification of *Klebsiella* isolates is very important from an epidemiological and clinical point of view. Ribosomal 16S rDNA gene sequences have been useful in defining bacterial relationships, including those of *Klebsiella* (Boye and Hansen, 2003), however, their value for delineating closely related species is limited because of scarce nucleotide variation. Identification of *Klebsiella* species and phylogenetic groups within *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* based on molecular methods can now be reliably achieved based on the sequencing of housekeeping genes such as *rpoB* (Drancourt et al., 2001) or *gyrA* and *parC* (Brisse and Verhoef, 2001). In this work, the amplification and partial sequencing of a 454 bp fragment of the *rpoB* gene achieved a great level of identification of the *Klebsiella* isolates. However, the analysis of this sequence did not discriminate *R. ornithinolytica* of *R. planticola*, as it has been described previously (Alves et al., 2006), being necessary to perform the ornithine decarboxylation test for the separation of isolates belonging to these species (Hansen et al., 2004). A high genetic diversity was found among the commensal and the bacteraemic isolates in this study, whereas that found in the isolates from the NICU strongly suggested a clonal dissemination. The PFGE profiles of the *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains revealed the existence of several pulsotypes (Figure 1), indicating a high level of genetic diversity. This could be due to the different origin of the isolates (clinical, human feces, breast milk and nosocomial outbreak).

In the phylogenetic analysis of the *K. pneumoniae* strains based on the *rpoB* gene, 94% of *K. pneumoniae* isolates clustered with KpI and 6% with KpII-A or KpII-B, while when the *gyrA* gene was used all isolates clustered with KpI (Brisse et al., 2004; Figure 1). In the tree constructed using the sequences of Fevre et al., (2005) and Alves et al. (2006) all our isolates match perfectly with clusters KpI, KpIIA or KpIIB, confirming the results obtained with our phylogenetic analysis. A predominance of KpI isolates was also found in previous works (Brisse et al., 2004; Alves et al., 2006). The only *K. variicola* identified in this study (K12-3) clustered in the KpIII group together with *K. variicola* F2R9^T (Figure 2). This indicates that KpIII corresponds to *K. variicola* as it has been reported previously by other authors (Rosenblueth et al., 2004; Alves et al., 2006). *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* and *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* appeared to be closely related to *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (Kp group on the phylogenetic tree), in agreement with earlier reports (Brisse et al., 2001; Drancourt et al., 2001).

Regarding *K. oxytoca* strains, the phylogenetical analysis based on the *rpoB* gene classified the isolates analyzed in the present study as belonging to KoI (85%), KoII (5%) and KoVI (10%) groups (Figure 2), and these results were confirmed using the tree constructed with the sequences of Fevre et al (2005) and Alves et al. (2006). In agreement with Alves et al. (2006), most *K. oxytoca* isolates belonged to the cluster KoII.

The phylogenetic tree with all sequences obtained in this study allowed to separate *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca*, and *R. planticola* in clearly defined clusters sustained by moderate bootstrap values. These values are in the range of those previously reported for the analysis of *Klebsiella rpoB* gene (Drancourt et al., 2001; Fevre et al., 2005; Rosenblueth et al., 2004).

Two *R. planticola* isolates, Ko1 and Ko10, clustered with the type strains *R. planticola* ATCC 33531^T and *R. ornithinolytica* ATCC 31898^T, respectively (Figure 2). Therefore, the phylogenetic analysis based on partial *rpoB* sequencing could not separate these species, as it had been observed by other authors (Brisse and Verhoef, 2001; Alves et al., 2006). A similar observation was made regarding the analysis of *gyrA* and *parC* gene sequences and ribotyping data (Brisse and Verhoef, 2001). In resume, the use of a 454 pb sequence of *rpoB* has been useful to identify and to reconstruct the phylogeny of *Klebsiella* species.

Globally, all *Klebsiella* strains analyzed were sensitive to most of the antibiotics assayed in this study, with the exception of *bla*_{CTX-M-15}-producing isolates from the NICU, supporting the situation of a nosocomial outbreak (Table 3, Figure 1). The NICU *bla*_{CTX-M-15}-producing *K. pneumoniae* K12-9 and the colonizer ZH91-24 exhibited resistance to carbapenems, demonstrating the wide dispersion of carbapenemases combined or not with ESBL among different environments (Nordmann et al., 2009; Lin et al., 2010; Lim et al., 2009). Risk factors associated with the acquisition of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* included prolonged hospitalization, intensive care unit stay, invasive devices, immunosuppression, and multiple antibiotic agents before initial culture (Woodford et al., 2004; Bratu et al., 2005).

ESBL-producing *K. pneumoniae* can cause infection outbreaks in NICUs (Mantilla et al., 2006; Shenoy et al., 2007; Kristof et al., 2007). In this study, some strains (*K. pneumoniae* K12-1, K12-2, K12-4, K12-6, K12-9 and K12-10; *K. oxytoca* K12-5 and K12-7) were isolated from haemocultures, vascular catheters, feces or the NICU environment during the investigation of a neonatal outbreak. Interestingly, all were ESBL-producing strains, suggesting the existence of a polyclonal outbreak. Although many outbreaks have been associated to the dissemination of a single clone of genotypically identical organisms (Paterson and Bonomo, 2005), polyclonal dissemination of different ESBL-producing *Klebsiella* strains can exist in the same unit at the same time (Fielt et al., 2000). Furthermore, genotypically unrelated strains may produce the same ESBL due to plasmid transfer between species (Bingen et al., 1993; Fielt et al., 2000). In this study, all *K. pneumoniae* strains that presented the CTX-M-15 genes harboured a plasmid of 75 kb, which was also present in the ESBL-producer strain *K. variicola* K12-3. Large plasmids and mobile elements can be involved in the spread of *bla*_{ESBL} genes to different bacterial species (Palucha et al., 1999; Bradford, 2001; Baraniak et al., 2002; Canton and Coque, 2006; Diestra et al., 2009).

Correlation between the source of the isolates, invasive vs. colonizer, and the carriage of virulence genes was not found and similar results have been reported previously (Podschum et al., 2001). None of the strains harbored *magA* and *rmpA* genes, which have been associated with the hypermucoviscosity phenotype in liver-invasive strains (Fang et al, 2004; Yu et al, 2006). In contrast, all *K. pneumoniae* strains presented the *fimH* gene encoding type 1 fimbrial adhesin, a fact that has also been described by other authors (Yu et al., 2006; Brisse et al, 2009). In addition we detected the *fimH* gene in two *K. variicola* isolates.

The *kfu* (iron-uptake system) gene was carried by a low proportion (15%) of the *K. pneumoniae*. Fang et al. (2004) showed that the *kfu* operon was present in most of the tissue-invasive *K. pneumoniae* strains but was absent from most of the non-

invasive ones. Later, this gene was found in 33% of *K. pneumoniae* isolates with a hypermucoviscosity phenotype (Yu et al., 2006) and reported to be clone-associated (Brisse et al., 2009). Interestingly, the two *K. variicola* isolates and one of the two *R. planticola* from the present study possessed the *kfu* gene.

The *wabG* gene, encoding proteins involved in LPS synthesis (Izquierdo et al., 2003), was present in all strains isolated from feces but, similarly to the *uge* gene (encoding uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase), it was less represented among the strains isolated from other sources. A proportion close to 100% of *uge* and *wabG* positive isolates has been reported among virulent clones of *K. pneumoniae* (Brisse et al., 2009) and, also, among strains isolated from patients with bacteremia (Yu et al., 2006). Differences between our results and those obtained by other authors (Fang et al., 2004; Yu et al., 2006; Brisse et al., 2009) could be due to the virulence of the *K. pneumoniae* isolates included in their studies, while most of our isolates are most probably opportunist commensal *K. pneumoniae* isolates.

Iron is essential for the growth of most bacterial pathogens, and the ability to acquire this element is frequently associated with bacterial virulence. To obtain iron, bacteria can remove iron from host via siderophore-mediated uptake systems. In our study, we have designed a novel multiplex PCR to detect genes associated to biosynthesis or as receptors of the siderophores aerobactin (*iutA*, *iucB*), enterobactin (*fepA*, *fepC*), and yersibactin (*fyuA*, *ybtT*). Enterobactin-related genes were the most frequently detected, being the gene encoding the receptor (*fepC*) more abundant than the structural gene (*fepA*). This indicates that these strains could capture iron without the production of the siderophore. In the case of yersibactin, both biosynthesis (*fyuA*) and receptor (*ybt*) genes were found in the same proportion (15%) while only a little proportion (9%) of the strains harboured the genes for the biosynthesis and the receptor of both siderophores, enterobactin and yersibactin. In contrast, aerobactin-related genes could not be detected. Most of the *K. oxytoca* strains, and also one of *K. variicola*, also contained the genes for the receptor of enterobactin (*fepC*) but none of them possessed that responsible for its synthesis (*fepA*). The gene for aerobactin biosynthesis (*iucB*), but not that encoding its receptor, was detected in some *K. oxytoca* strains and the yersibactin biosynthesis (*fyuA*) and receptor (*ybt*) genes were less frequent than in *K. pneumoniae* strains. Thus, the genes for siderophores aerobactin, enterobactin and yersibactin were less represented in the *K. oxytoca* than in the *K. pneumoniae* isolates. Different studies have been focused on the distribution of siderophores among *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* clinical isolates, and found that nearly all of them produced enterobactin while a much smaller percentage produced either aerobactin or yersibactin (Podschum et al., 1992; Schubert et al., 2000; Koczura and Kaznowski, 2003).

The ability of the *Klebsiella* strains to produce antimicrobial compounds both in solid and liquid medium was also addressed in this study. Two isolates of *K. pneumoniae*, MV91-1 and Kp5 were able to produce antimicrobial compounds against other *Klebsiella* strains when assayed on solid medium. The inhibitory activity of both strains was sensitive to proteinase K, indicating that they produce bacteriocins, which are defined as antimicrobial compounds of proteinaceous nature with activity against related species (Tagg et al., 1976).

VI.6 CONCLUSIONS

Here we have described the usefulness of sequencing a short region of the *rpoB* gene to identify and establish phylogenetic relations between *Klebsiella* isolates. Attending to the virulence factors studied, production of siderophores, ability to form biofilms, content and size of plasmids or phylogenetic analysis we were unable to distinguish between *Klebsiella* isolates from breast milk of healthy women and faeces of their healthy lactating newborns and *Klebsiella* isolates from community acquired infections or nosocomial outbreaks. The only difference observed was the antibiotic susceptibility profiles showed by strains isolated from a nosocomial outbreak, being ESBLs producers and harbouring CTX-M-15 genes.

Acknowledgements

This work was supported by the **CSD2007-00063** (FUN-C-FOOD, Consolidar-Ingenio 2010) and AGL2010-15420 projects from the Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain). We would like to express our gratitude to Fernando Chaves, Rafael Cantón, Virginia Martín, Esther Jiménez, and the Hospital 12 de Octubre and Ramón y Cajal hospitals for providing several of the *Klebsiella* isolates.

VI.7 REFERENCES

1. Alves MS, Dias RC, de Castro AC, Riley LW, Moreira BM: **Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3640-3646.
2. Baraniak A, Fiett J, Sulikowska A, Hryniewicz W, Gniadkowski M: **Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum beta-lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland.** *Antimicrob Agents Chemother* 2002, **46**:151-159
3. Bingen EH, Desjardins P, Arlet G, Bourgeois F, Mariani-Kurkdjian P, Lambert-Zechovsky NY, Denamur E, Philippon A, Elion J: **Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital.** *J Clin Microbiol* 1993, **31**:179-184
4. Boddicker JD, Anderson RA, Jagnow J, Clegg S: **Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material.** *Infect Immun* 2006, **74**:4590-4597
5. Boye K, Hansen DS: **Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*.** *Int J Med Microbiol* 2003, **292**:495-503
6. Bradford, P: **Extended-spectrum β -lactamases.** *Clin Microbiol Rev* 2001, **14**:933-951
7. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J: **Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*.** *Arch Intern Med* 2005, **165**:1430-1435
8. Brisse S, Verhoef J: **Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**:915-924
9. Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S, Grimont PA: **Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by Restriction of the amplified capsular antigen gene cluster.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:3388-3398
10. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P: **Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization.** *PLoS One* 2009, **4**:e4982. doi: 10.1371/journal.pone.0004982
11. Buffenmyer CL., Rycheck, RR, Yee RB: **Bacteriocin (klebocin) sensitivity typing of *Klebsiella*.** *J Clin Microbiol* 1976, **4**:239-244.
12. Cantón R, Coque TM: **The CTX-M beta-lactamase pandemic.** *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:466-475

13. Carniel, E: **The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island.** *Microbes Infect* 2001, **3**:561-569
14. Chavan M, Rafi H, Wertz J, Goldstone C, Riley MA: **Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*.** *J Mol Evol* 2005, **60**:546-56
15. Chong Y, Ito Y, Kamimura T: **Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.** *Infect Genet Evol* 2011, **11**:1499-1504
16. Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT: **Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection.** *Infect Immun* 2004, **72**:3783-3792
- Diestra K, Juan C, Curiao T, Moyá B, Miró E, Oteo J, Coque TM, Pérez-Vázquez M, Campos J, Cantón R, Oliver A, Navarro F: **Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*.** *J Antimicrob Chemother* 2009, **63**:60-66
17. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P: **Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov.** *Int J Syst Evol Microbiol* 2001, **51**:925-932
18. Fabbri G, Panico M, Dallolio L, Suzzi R, Ciccia M, Sandri F, Farruggia P: **Outbreak of ampicillin/piperacillin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit (NICU): investigation and control measures.** *Int J Environ Res Public Health* 2013, **10**:808-815
19. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT: **A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications.** *J Exp Med* 2004, **199**:697-705
20. Fevre C, Passet V, Weill FX, Grimont PAD, Brisse S: **Variants of the *Klebsiella pneumoniae* OKP chromosomal beta-lactamase are divided into two main groups, OKP-A and OKP-B.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**:5149-5152
21. Fielt J, Palucha A, Miaczynska B, Stankiewicz M, Przondo-Mordarska H, Hryniewicz W, Gniadkowski M: **A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *klebsiellae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000, **44**:1499-1505
22. Fletcher, M: **Adhesion and biofilm development of acetate-, propionate-, and butyrate-degrading microorganisms on glass surfaces.** *Can J Microbiol* 1977, **23**:1-6
23. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P: **Survival strategies of infectious biofilms.** *Trends Microbiol* 2005, **13**:34-40

24. Gerlach GF, Clegg S, Allen, BL: **Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*.** *J Bacteriol* 1989, **171**:1262-1270
25. Gillor O, Vriezen JAC, Riley MA: **The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation.** *Microbiology* 2008, **154**:1783-1792
26. Gotoff SP: **Sepsis in the newborn.** In *Infectious diseases of children*. 9th edition. Edited by Krugman S, Katz SL, Gershon AA, Wilfert CM. Mosby: Year Book, 1992:402-418
27. Hansen DS, Aucken HM, Abiola T, Podschun R: **Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests.** *J Clin Microbiol* 2004, **42**:3665-3669
28. Harris LJ, Daescheyl MA, Stiles ME, Klaenhammer TR: **Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*.** *J Food Prot* 1999, **52**:384-887
29. Heikkilä MP, Saris PEJ: **Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk.** *J Appl Microbiol* 2003, **95**:471-478
30. Izquierdo L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomas JM, Regué M. **The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence.** *J Bacteriol* 2003, **185**:7213-7221
31. Jagnow J, Clegg S: ***Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces.** *Microbiology* 2003, **149**:2397-2405
32. Jarlier V, Nicolas M-H, Fournier G, Philippon A: **Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility pattern.** *Rev Infect Dis* 1988, **10**:867-878
33. Jiménez E, Fernández L, Delgado S, García N, Albújar M, Gómez A, Rodríguez JM: **Assessment of the bacterial diversity of human colostrum by cultural-based techniques. Analysis of the staphylococcal and enterococcal populations.** *Res Microbiol* 2008a, **159**:595-601.
34. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N, Jarlod M, Fernández L, Gómez A, Rodríguez JM: ***Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infant.** *BMC Microbiology* 2008b, **8**:143
35. Kang CI, Kim SH, Bang JW, Kim HB, Kim NJ, Kim EC, Oh MD, Choe KW: **Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance.** *J Korean Med Sci* 2006, **21**:816-822

36. Koczura R, Kaznowski A: **Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*.** *Microb Pathog* 2003, **35**:197-202
37. Kovtunovych G, Lytvynenko T, Negrutska V, Lar O, Brisse S, Kozyrovska N: **Identification of *Klebsiella oxytoca* using a specific PCR assay targeting the polygalacturonase *pehX* gene.** *Res Microbiol* 2003, **154**:587-92
38. Kristóf K, Szabó D, Marsh JW, Cser V, Janik L, Rozgonyi F, Nobilis A, Nagy K, Paterson DL: **Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007, **26**:563-570
39. Lin CF, Hsu S-K, Chen C-H, Huang J-R, Lo H-H: **Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan.** *J Med Microbiol* 2010, **59**:665-671
40. Lim KT, Yeo CC, Md Yasin R., Balan G, Thong KL: **Characterization of multiply-drug resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Malaysian hospitals.** *J Med Microbiol* 2009, **58**:1463-1469
41. Lockhart SR, Abramson MA, Beekmann SE, Gallagher G, Riedel S, Diekema DJ, Quinn JP, Doern GV: **Antimicrobial resistance among gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004.** *J Clin Microbiol* 2007, **45**:3352-3359
42. Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT: **Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection.** *J Infect Dis* 2005, **192**:117-128
43. Mantilla JR, Reguero MT, González EB, García IA, Leal AL, Espinal PA, Alpuche C, Valderrama IA, Garzón MI, Olarte NM: **Molecular characterization of an outbreak caused by CTX-M-12 producing *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital's neonatal intensive care unit.** *Biomedica* 2006, **26**:408-414
44. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM: **Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut.** *J Pediatr* 2003, **143**:754-758
45. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, Rodríguez JM: **Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women.** *Res Microbiol* 2007a, **158**:31-37
46. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM: **Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut.** *J Appl Microbiol* 2007b, **103**:2638-2644

47. Martín R, Jiménez E, Heilig HG, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM: **Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**:965-969
48. Nordmann P, Cuzon G, Naas T: **The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.** *Lancet Infect Dis* 2009, **9**:228-36
49. O'Toole, G.A. and Kolter, R: **Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis.** *Mol Microbiol* 1998, **28**:449-461
50. Palucha A, Mikiewicz B, Hryniewicz W, Gniadkowski M: **Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital.** *J Antimicrob Chemother* 1999, **44**:489-499
51. Paterson DL, Bonomo RA: **Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update.** *Clin Microbiol Rev* 2005, **18**:657-686
52. Payne SM, Mey AR: **Pathogenic *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*.** In *Iron Transport in Bacteria*. Edited by Crosa JH, Mey AR, Payne SM. Washington, DC: ASM Press; 2004:199-218
53. Podschun R, Fischer A, Ullmann U: **Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources.** *Zentbl Bakteriol* 1992, **276**:481-486
54. Podschun R, Ullmann U: ***Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors.** *Clin Microbiol Rev* 1998, **11**:589
55. Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U: **Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors.** *Appl Environ Microbiol* 2001, **67**:3325-3327
56. Raymond KN, Dertz EA, Kim SS: **Enterobactin: an archetype for microbial iron transport.** *Proc Natl Acad Sci* 2003, **100**:3584-3588
57. Regue M, Climent N, Abitio N, Coderch N, Merino S, Izquierdo L, Altarriba M, Tomás JM: **Genetic characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* gene cluster, involved in core lipopolysaccharide biosynthesis.** *J Bacteriol* 2001, **183**: 3564-3573
58. Rettedal S, Høyland LI, Natås O, Sundsfjord A, Øymar K: **Risk factors for acquisition of CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during an outbreak in a neonatal intensive care unit in Norway.** *Scand J Infect Dis* 2013, **45**:54-58
59. Riley MA, Pinou T, Wertz JE, Tan Y, Valletta CM: **Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*.** *Plasmid* 2001, **45**:209-221
60. Riley MA, Wertz JE: **Bacteriocins: evolution, ecology, and application.** *Annu Rev Microbiol* 2002, **56**:117-137

61. Riley MA, Goldstone CM, Wertz JE, Gordon D: **A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare.** *J Evol Biol* 2003, **16**:690-697
62. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E: ***Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates.** *Syst Appl Microbiol* 2004, **27**:27-35
63. Saitou N, Nei M: **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees.** *Mol Biol Evol* 1987, **4**:406-425
64. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP: **Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection.** *Am J Med* 1991, **91**:72S.
65. Schubert S, Cuenca S, Fischer D, Heesemann J: **High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: Prevalence and functional expression.** *J Infect Dis* 2000, **182**:1268-1271
66. Schwyn B, Neilands JB: **Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores.** *Analytical Biochem* 1987, **160**:47-56
67. Shenoy S, Hegde A, Dominic SR, Kamath S, Arvind N: **An outbreak of extended spectrum b-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit.** *Indian J Pathol Microbiol* 2007, **50**:669-670
68. Tagg JR, Dajani AS, Wannamaker LW: **Bacteriocins of Gram-positive bacteria.** *Bacteriol Rev* 1976, **40**:722-756
69. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: **MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1596-1599.
70. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ: **CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice.** *Nucleic Acids Res* 1994, **22**:4673-4680
71. Turner PJ: **Extended-spectrum β -lactamases.** *Clin Infect Dis* 2005, **41**:S273-S275
72. Wang H, Kelkar S, Wu W, Chen M, Quinn JI: **Clinical isolates of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of CTX-M-3 at a hospital in China.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**:790-793
73. Williams P, Tomas JM: **The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*.** *Rev Med Microbiol* 1990, **1**:196-204
74. Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ: **Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases.** *J Antimicrob Chemother* 2006, **57**:154-155
75. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM: **Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-**

hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center.
Antimicrob Agents Chemother 2004, **48**:4793-4799

76. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC, Fung CP, Chuang YC:
**Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused
by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan.** *Clin Infect Dis* 2006, **42**:1351-1358

Table 1. Bacterial isolates used in this study. Identification of isolates was carried out by partial sequencing of the *rpoB* gene

Strain	Origin	Source	Strain	Origin	Source
<i>Klebsiella pneumoniae</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>		
LMV2-9	Breast milk	FVM	HA001	Feces	FVM
LMV6-5	Breast milk	FVM	HA009	Feces	FVM
LMV90-10	Breast milk	FVM	HI2-45	Feces	FVM
LMV90-11	Breast milk	FVM	HV1-02	Feces	FVM
MV31-21	Faeces	FVM	HV1-11	Feces	FVM
MV91-1	Faeces	FVM	HV2-11	Feces	FVM
MV91-24	Faeces	FVM	HV2-03	Feces	FVM
MV91-25	Faeces	FVM	LG5-52	Breast milk	FVM
MV91-28	Faeces	FVM	MV11	Meconium	FVM
MV91-42	Faeces	FVM	Ko2	Blood	RYC
Ko9	Blood	RYC	Ko3	Blood	RYC
Kp1	Blood	RYC	Ko4	Blood	RYC
Kp2	Blood	RYC	Ko5	Blood	RYC
Kp3	Blood	RYC	Ko6	Blood	RYC
Kp4	Blood	RYC	Ko7	Blood	RYC
Kp5	Blood	RYC	Ko8	Blood	RYC
Kp6	Blood	RYC	Ko11	Blood	RYC
Kp7	Blood	RYC	Ko12	Blood	RYC
Kp8	Blood	RYC	K12- 5	Faeces	HUDO
Kp9	Blood	RYC	K12- 7	Faeces	HUDO
Kp10	Blood	RYC			
Kp11	Blood	RYC	<i>K. variicola</i>		
Kp12	Blood	RYC	MV3-1	Faeces	FVM
Kp13	Blood	RYC	K12- 3	NICU	HUDO
Kp14	Blood	RYC			
Kp15	Blood	RYC	<i>Raoultella planticola</i>		
K12- 1	Blood	HUDO	Ko1	Blood	RYC
K12- 2	Blood	HUDO	Ko10	Blood	RYC
K12- 4	NICU	HUDO			
K12- 6	Catheter	HUDO			
K12- 8	Faeces	HUDO			
K12- 9	Faeces	HUDO			
K12- 10	Faeces	HUDO			

NICU, Neonatal Intensive Care Unit. HUDO, Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid, Spain). FVM, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (Madrid, Spain). RYC, Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid, Spain)

Table 2. Oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence (5'-3')	Reference
Identification		
KrpoB-for	TTATGGACCAGAACAACC	This study
KrpoB-rev	AACGGGATCAGGGC	
peH-A	GGACTACGCCGTCTATCGTCAAG	Kovtunovych et al. (2003)
peH-C	GATACGGAGTATGCCTTTACGGTG	
peH-D	TAGCCTTTATCAAGCGGATACTGG	Brisse et al. (2001)
gyrAA	CGCGTACTATACGCCATGAACGTA	
gyrAC	ACCGTTGATCACTTCGGTCAGG	
Bacteriocin		
KlebC-For	GCTCTGTAACCTTCAAGTTCTC	Chavan et al. (2005)
KlebC-Rev	CAAGCAAGATTACGGTCTACTC	
Virulence factors		
iutA-F	GATGCCGCGACCATAGTATT	This study
iutA-R	TGAGTCGTTGCGATTCTACC	
iucB-F	TGTTCAACCAACCAGCAGATG	
iucB-R	GTTCACAGCGGATATGGACT	
fepA-F	TACTTCTTCGGCTCCTGCTT	
fepA-R	CAGCAACCAGTTCACGGATA	
fepC-F	CTTGTTACCCGCTCTTCAT	
fepC-R	TCACTTCACCGCCATTATCG	
FyuA-F	CCTTCCGGTTCGTTAATCGT	
FyuA-R	GCCATAGCGCGTATCAATCA	
YbtT-F	GTGACGCAATCTGCAATGTG	
YbtT-R	ATCCGCCAATGTCTATCAGC	
magA-F	GGTGCTCTTTACATCATTGC	Fang et al. (2004)
magA-R	GCAATGGCCATTTGCGTTAG	
rmpA-F	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA	
rmpA-R	CTTGCATGAGCCATCTTTCA	Yu et al. (2006)
wabG-F	ACCATCGGCCATTTGATAGA	
wabG-R	CGGGGCAGATCCATATC	
uge-F	TCTTCACGCCTTCCTTCACT	
uge-R	GATCATCCGGTCTCCCTGTA	
kfuB-F1179	GAAGTGACGCTGTTTCTGGC	
kfuC-R649	TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	
fimH-F	TGCTGCTGGGCTGGTCGATG	
fimH-R	GGGAGGGTGACGGTGACATC	
<i>bla</i>_{CTX-M}		
P1	ATGGTTAAAAAATCACTGCGCC	Wang et al. (2003)
P2b	TCCCGACGGCTTTCCGCCTT	
CTX-M-1G-F	AAAAATCACTGCGCCAGTTC	Woodford et al. (2006)
CTX-M-1G-R	AGCTTATTCATCGCCACGTT	
CTX-M-2G-F	CGACGCTACCCCTGCTATT	
CTX-M-2G-R	CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	
CTX-M-9G-F	CAAAGAGAGTGCAACGGATG	
CTX-M-9G-R	ATTGGAAAGCGTTCATCACC	

Table 3. Antibiotic resistance (%) of *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* isolates.

Antimicrobial Agent	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>		
	Blood n=16	NICU n=8	Colonizer n=10	Blood n=9	NICU n=2	Colonizer n=9
Amoxicillin/clavulanic acid	-	75	-	-	-	-
Piperacillin	6.2	87.5	-	11.1	100	-
Piperacillin/tazobactam	6.2	12.5	10	11.1	-	-
Aztreonam	-	87.5	-	-	100	-
Cefazolin	6.2	87.5	-	22.2	100	-
Cefuroxime	-	87.5	-	11.1	50	-
Cefepime	-	87.5	-	-	-	-
Cefixime	6.2	87.5	-	11.1	100	-
Cefotaxime	-	87.5	-	-	100	-
Ceftazidime	-	87.5	-	-	100	-
Cefoxitin	-	-	-	-	-	-
Imipenem	-	-	10	-	-	-
Meropenem	-	-	10	-	-	-
Gentamicin	-	87.5	10	-	-	-
Tobramycin	-	87.5	10	-	-	-
Amikacin	-	-	10	-	-	-
Tetracycline	18.7	75	-	11.1	-	-
Ciprofloxacin	6.2	-	-	11.1	-	-
Levofloxacin	6.2	-	-	-	-	-
Norfloxacin	6.2	-	-	-	-	-
Chloramphenicol	-	12.5	20	-	-	-
Fosfomycin	-	-	10	-	-	-
SxT	6.2	-	-	-	-	-

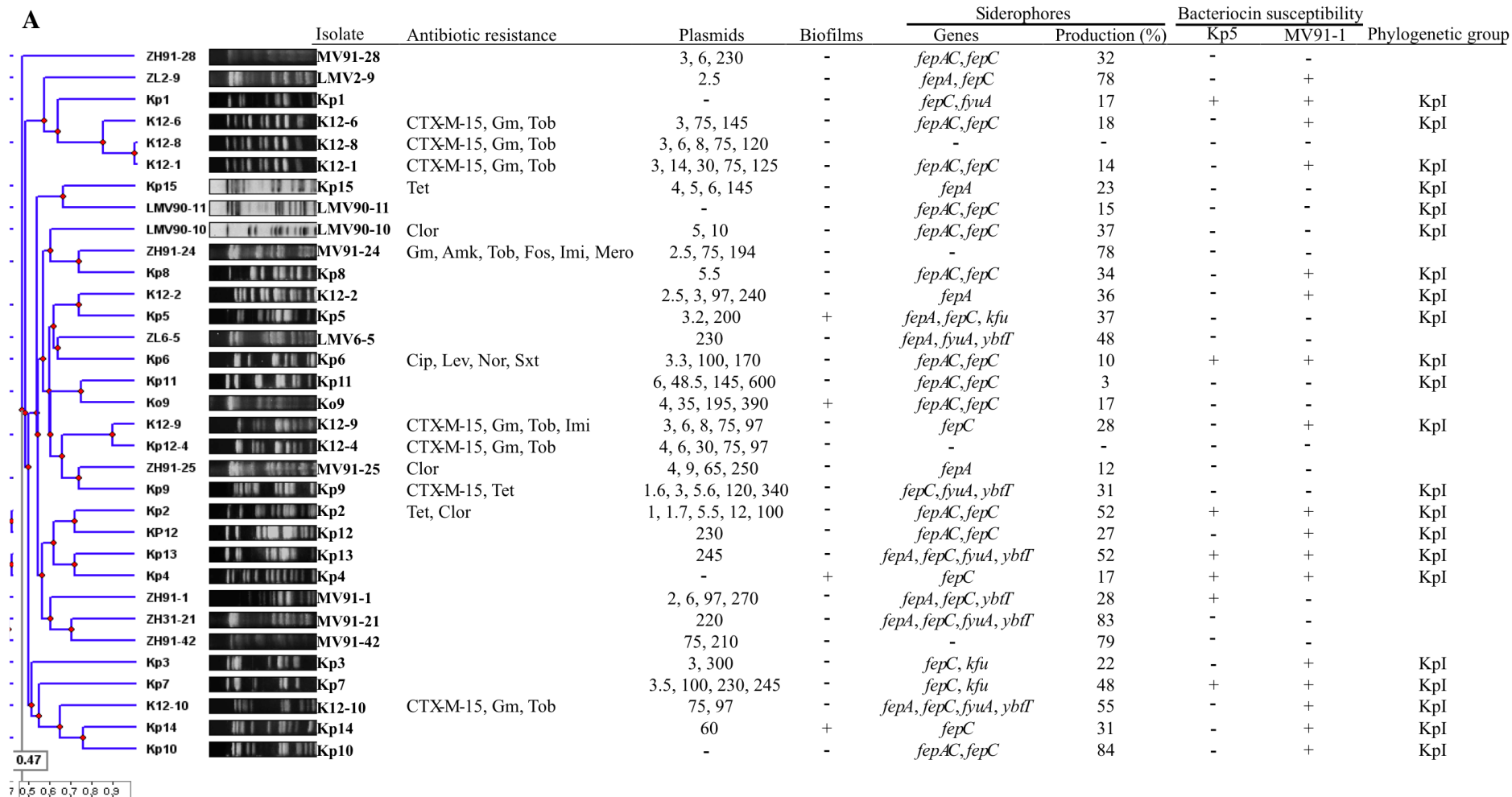
SxT: Trimethoprim/sulfamethoxazole.

(-): no resistance.

Table 4. Presence of genes (%) for putative virulence factors in *K. pneumoniae* and *K. oxytoca* strains isolated from meconium, feces and breast milk of healthy individuals and from clinical neonatal (NICU) or adult (CA) strains.

Gene ¹ (n=20)	<i>K. pneumoniae</i>					<i>K. oxytoca</i>			
	Feces (n=6) ²	Milk (n=4)	NICU (n=7)	CA (n=16)	Total (n=33)	Feces (n=9)	NICU (n=2)	CA (n=9)	Total
<i>mgaA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>rmpA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>wabG</i>	100	50	42.86	6.25	36,36	-	-	-	-
<i>uge</i>	66.66	25	71.42	12.5	36,36	-	-	-	-
<i>fimH</i>	100	100	100	93.75	96,96	-	-	-	-
<i>kfu</i>	16.66	-	14.28	18.75	15,15	-	-	-	-
<i>iutA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>iucB</i>	-	-	-	-	-	11.11	-	11.11	10
<i>fepA</i>	66.66	100	57.14	68.75	69.69	-	-	-	-
<i>fepC</i>	50	75	85.71	93.75	81.81	66.66	-	55.55	55
<i>fyuA</i>	16.66	25	14.28	12.5	15.15	33.33	-	88.88	55
<i>ybtT</i>	16.66	25	14.28	12.5	15.15	-	-	11.11	5
<i>iutA, iucB</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>fepA, fepC</i>	50	75	42.85	62,5	57.57	-	-	-	-
<i>fyuA, ybtT</i>	16.66	25	14.28	12.5	15.15	-	-	-	-
<i>fepA, fepC, fyuA, ybtT</i>	16.66	-	14.28	6,25	9.09	-	-	-	-

¹*mgaA* responsible for the hypermucoviscosity phenotype of *K. pneumoniae* strains causing liver abscess (Fang et al., 2004); *rmpA*, regulator of extracapsular polysaccharide synthesis that confers mucoid phenotype (Yu et al., 2006); *wabG*, biosynthesis of lipopolysaccharide (LPS) (Izquierdo et al, 2003); *uge*, biosynthesis of capsule (CPS) and lipopolysaccharide (LPS) (Regue et al 2004); *fimH*, type 1 fimbrial adhesin (Gerlach et al., 1989); *kfu*, iron uptake system (Ma et al., 2005); *iutA* and *iucB*, aerobactin iron uptake system (Payne and Mey, 2004); *fepA* and *fepC*, enterobactin iron uptake system (Raimond 2003); *fyu* and *ybtT*, yersiniabactin iron uptake system (Carniel 2001).²n: number of strains assayed.



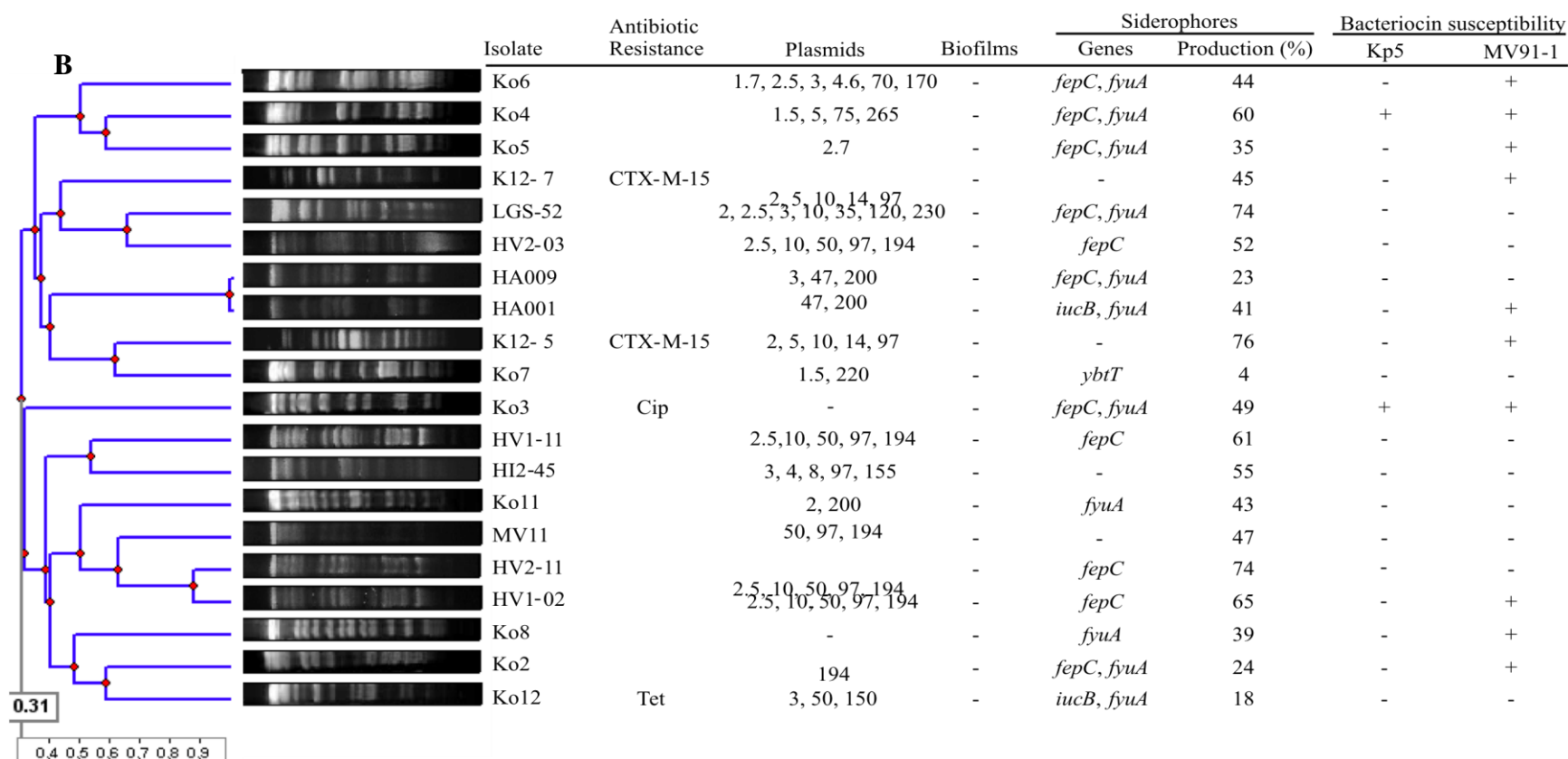


Figure 1. PFGE profiles and features of *K. pneumoniae* (A) and *K. oxytoca* (B) isolates used in this study. The ESBLs producer isolates harbored the gene encoding the CTX-M-15 β -lactamase (*bla*_{CTX-M-15}). Abbreviations: Gm, gentamicin; Tob, tobramycin; Tet, tetracycline; Clor, chloramphenicol; Amk, amikacin; Fos, fosfomycin; Imi, imipenem; Mero, meropenem; Cip, ciprofloxacin; Lev, Levofloxacin; Nor, norfloxacin; Sxt, trimethoprim/sulfamethoxazole. Plasmid sizes are shown in kpb. The biofilm formation ability of the isolates was analyzed in polyvinylchloride plastic (PVC) microtitre plates according to the protocol of Fletcher (1977). Production of siderophores was quantified by the method of Schwyn and Neiland (1987). Antimicrobial activity was assayed by the direct method (Tagg et al., 1976); +, sensitive; -, resistant. The phylogenetic groups were obtained by PCR–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of the *gyrA* gene as reported by Brisse et al. (2004).

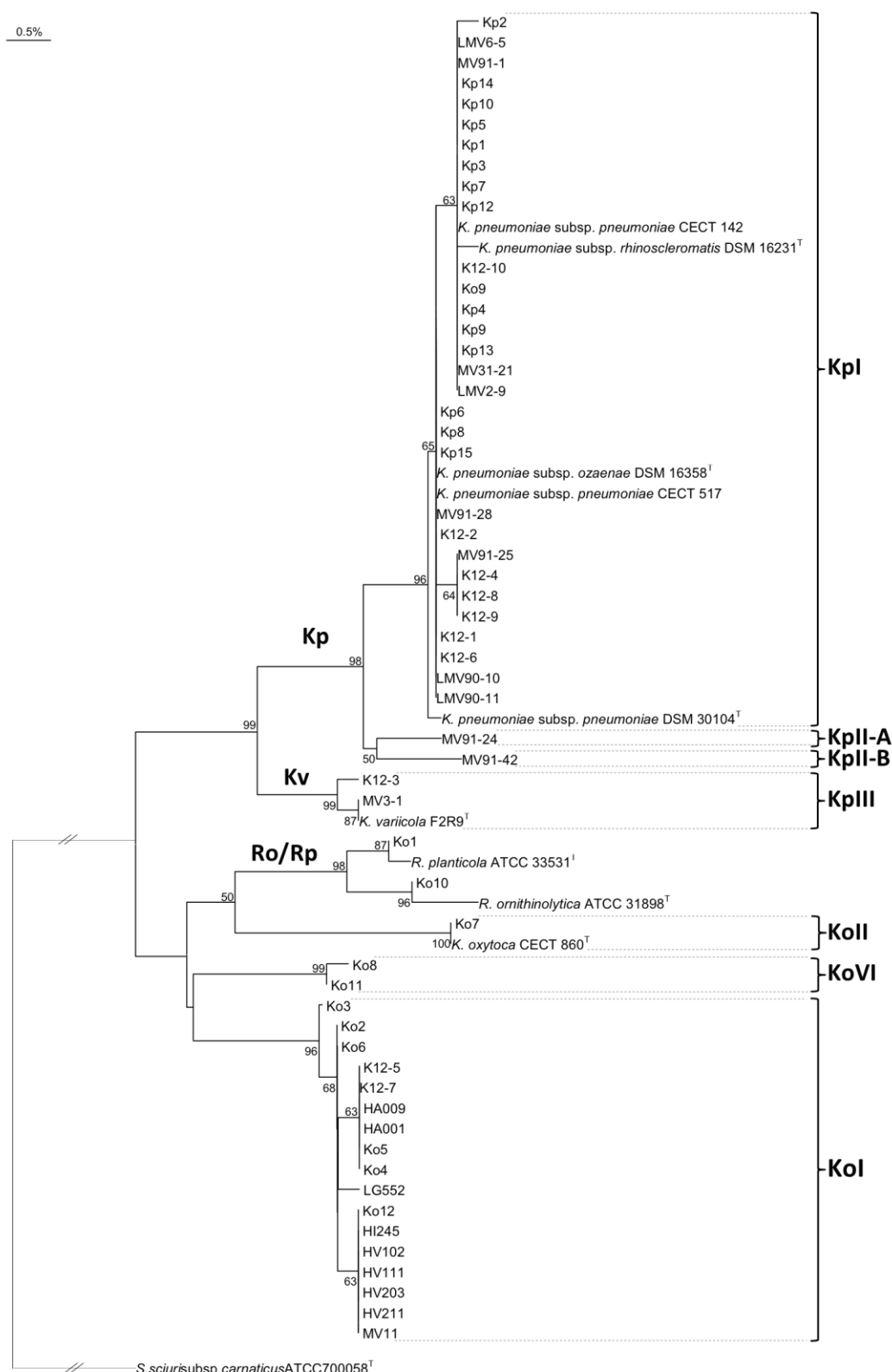
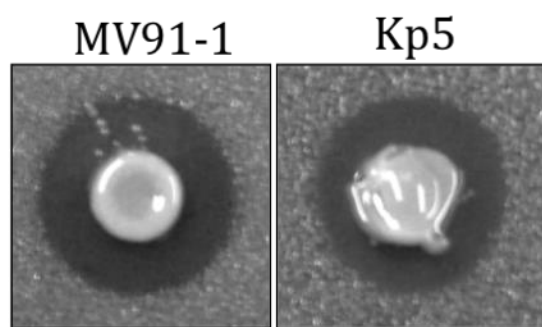


Figure 2. Phylogenetic relationships of 56 *Klebsiella* isolates and reference type strains by comparison of partial *rpoB* gene sequences (454 bp). The tree was based on the neighbour-joining method, using the Jukes-Cantor parameter model. Numbers on the tree indicate bootstrap values calculated for 1000 subsets for branch-points greater than 50%. Bar, 0.05% nucleotide changes per nucleotide position. Clusters Kp, Kv, Rp/Ro, and Ko are indicated by arrows. For intraspecies groups (KpI, KpIIA, KpIIB, KpIII, KoII, KoVI and KoI) two other trees that included also the *rpoB* sequences studied by other authors (Fevre et al., 2005; Alves et al., 2006) were constructed (data not shown).



Indicator strain: *K. pneumoniae* K12-5

Figure 3. Antimicrobial activity of *K. pneumoniae* MV91-1 and Kp5 against *K. pneumoniae* K12-5 assayed by the direct method (Tagg et al., 1976).

VII. DISCUSIÓN

VII.1 COLONIZACIÓN INTESTINAL DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS

La colonización bacteriana del intestino infantil es un proceso fundamental para el individuo porque las interacciones que se establecen entre la microbiota intestinal y el hospedador tienen un papel decisivo, no sólo en la función intestinal, sino también en la salud general del individuo. Por ello, esclarecer cómo se adquiere esta microbiota y describir su diversidad y función es un tema de gran interés. La colonización bacteriana del intestino humano es un proceso complejo y progresivo que se inicia, a pequeña escala, en las últimas fases del periodo fetal. Tras el nacimiento, se intensifica drásticamente debido al contacto del neonato con microorganismos procedentes de la microbiota vaginal, intestinal y/o mamaria de la madre y del medio ambiente que le rodea (Buddington et al., 2010; Mackie et al., 1999; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009). En consecuencia, diversos factores, como la composición de la microbiota materna, la EG, la forma y lugar de nacimiento, la medicación (particularmente los antibióticos) o la alimentación, juegan papeles claves en un proceso del que dependen funciones tan importantes como la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos o el desarrollo del sistema inmunitario (Hooper y Gordon, 2001; Martino et al., 2008).

A diferencia de los RN a término, los prematuros se caracterizan por tener una gran inmadurez que se manifiesta, principalmente, por su incapacidad para mantener la temperatura corporal, la predisposición a infecciones, las dificultades respiratorias, la falta de reflejos necesarios para su supervivencia (como el de búsqueda, el de succión o el de deglución) y la intolerancia digestiva a alimentos que no sean la leche humana. No obstante, los avances en neonatología han conseguido reducir la mortalidad y morbilidad de los neonatos prematuros de forma significativa en los países desarrollados. Aún así, los neonatos nacidos prematuramente están sometidos a múltiples factores que pueden alterar el proceso de colonización del intestino, incluyendo el tratamiento antibiótico de la madre inmediatamente antes del parto (por sospecha de corioamnionitis, por rotura prematura de membranas o por colonización recto-vaginal por *Streptococcus agalactiae*), el tratamiento empírico con antibióticos tras el nacimiento (Madan et al., 2012; Schumann et al., 2005), la mayor frecuencia de parto por cesárea (nuevamente con administración de antibiótico a la madre), la separación de la madre, las maniobras invasivas (SNG, tubos endotraqueales, accesos vasculares) y la estancia prolongada en la UCIN con una elevada prevalencia de microorganismos hospitalarios potencialmente patógenos (Westerbeek et al., 2006). Los escasos trabajos existentes al iniciarse esta Tesis Doctoral sugerían que todos estos factores provocaban una gran distorsión en el patrón de colonización del intestino neonatal y que este hecho tenía consecuencias negativas para la pareja madre-hijo (Tanaka et al., 2009).

En la presente Tesis Doctoral se planteó como objetivo estudiar el establecimiento de la microbiota intestinal en RN prematuros ingresados en una UCIN entre octubre de 2009 y julio de 2010 con un periodo de hospitalización que osciló entre 27 y 116 días. Inicialmente, se evaluó la sucesión de las especies bacterianas en el meconio y en las heces de 26 RN prematuros durante su estancia en la UCIN utilizando técnicas dependientes de cultivo. De los participantes en este estudio, se seleccionó una cohorte más pequeña de 14 individuos para realizar un análisis más

exhaustivo de la microbiota intestinal del meconio y las heces a las 3 semanas de vida mediante técnicas moleculares (DGGE y micromatrices de DNA o HITChip). Al comparar los resultados obtenidos con técnicas independientes de cultivo con los recabados previamente utilizando técnicas dependientes de cultivo se observó que, en conjunto, se obtenían resultados muy similares.

Por lo general, los niños prematuros, debido a su inmadurez, presentan un retraso en el establecimiento de la colonización intestinal que, a menudo, se ha descrito como una situación aberrante en comparación con los niños sanos nacidos a término (Koenig et al., 2011; Palmer et al., 2007). Además, la colonización en estos RN prematuros parece ser específica de cada individuo y sin un patrón común entre ellos (Barrett et al., 2013). Esta microbiota aberrante parece afectar a la salud del niño y aumentar el riesgo de infecciones gastrointestinales, como la NEC (Claud y Walker, 2001; Siggers et al., 2011). El riesgo de sepsis en el RN prematuro se ha asociado a la presencia de *Proteobacterium* y *Firmicutes* (principalmente, *Staphylococcus*), mientras que en individuos prematuros con mejor pronóstico, que sólo requieren la administración de antibiótico durante un periodo inferior a 3 días y no sufren sepsis, se observa un aumento en la frecuencia relativa de microorganismos anaerobios y un perfil microbiológico semejante al de individuos “maduros” sanos, incluyendo la presencia de *Clostridium*, *Klebsiella* y *Veillonella* (Madan et al., 2012).

Normalmente, la microbiota de los RN prematuros está dominada por bacterias que se encuentran de forma habitual en el ambiente hospitalario, donde existe un alto uso de antibióticos, especialmente en las UCIN. Así, por ejemplo, la presencia de *Serratia* en heces de niños está fuertemente relacionada con parámetros hospitalarios, como la antibioterapia y la ventilación mecánica (Moles et al., 2013). En los RN prematuros, el temor a infecciones, y particularmente a las sepsis, determina, con frecuencia, un uso precoz de antibióticos de amplio espectro. Esta práctica aumenta el riesgo de colonización por bacterias multirresistentes (De Man et al., 2000). Del mismo modo, se ha demostrado que la estancia en la UCIN influye en la colonización por clostridios, componentes habituales de la microbiota de los RN prematuros, que retrasa el establecimiento de otros anaerobios (Ferraris et al., 2012). Sin embargo, la elevada prevalencia de clostridios no tiene relación ni con el empleo de terapias antibióticas ni con una elevada resistencia a antibióticos (Ferraris et al., 2012).

La combinación de las técnicas dependientes e independientes de cultivo permite estudiar en profundidad la microbiota de las muestras analizadas. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral muestran una buena correlación entre ambos tipos de técnicas, aunque la técnica de las micromatrices de DNA (HITChip) es mucho más sensible y ha permitido la detección de una mayor diversidad bacteriana. Algunas de las discrepancias que se han apreciado en los resultados obtenidos con ambas técnicas pueden ser debido a las diferencias existentes en la recuperación/supervivencia de distintos grupos bacterianos después de la descongelación de las muestras y a las complejas necesidades nutricionales de algunas especies para su cultivo. Otra diferencia entre los métodos microbiológicos tradicionales y los métodos moleculares podría ser producida por el sesgo introducido por la PCR debido a su alto nivel de detección cuando las especies se encuentran en una concentración muy baja en las muestras, según lo publicado en estudios anteriores (Rouge et al., 2010).

En general, el análisis de meconio de RN prematuros reveló una alta variabilidad interindividual, en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores

(Gosalbes et al. 2013; Mshvildadze et al., 2010). La diversidad bacteriana en las muestras de meconio fue menor que en las de heces, aunque los índices de diversidad obtenidos en ambos tipos de muestras mediante el HITChip fueron más altos que los descritos previamente en la bibliografía (Mshvildadze et al., 2010; Madan et al., 2012; Gosalbes et al. 2013).

En las muestras de meconio predominaron *Bacillus* y otros *Firmicutes*, mientras que en las de heces lo hizo *Proteobacterium*. A nivel de género, los más frecuentes en las muestras de meconio fueron *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus*, pero en las heces predominaron rápidamente los miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, tales como *Escherichia*, *Klebsiella* y *Serratia*, como ya habían observado otros autores (Blakey et al., 1982; Gewolb et al., 1999; Jacquot et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Magne et al., 2006; Moles et al., 2013; Mshvildadze et al., 2010; Sakata et al., 1985a; Schwiertz et al., 2003). En un trabajo previo (Jimenez et al., 2008) en el que se analizaron muestras de meconio de RN a término sanos del mismo hospital, utilizando métodos dependientes de cultivo, las bacterias predominantes detectadas fueron *E. coli* y *Leuconostoc* sp. Recientemente Gosalbes et al (2013) describieron esos mismos resultados en la microbiota de RN a término sanos mediante el empleo de técnicas moleculares. En cambio, en este trabajo, en las muestras de meconio de niños prematuros se detectó *E. coli* sólo por HITChip y además con una señal de baja intensidad, mientras que por métodos de cultivo no se pudo aislar ninguna de esas dos especies. Debe tenerse en cuenta que la congelación puede introducir sesgos en los métodos de cultivo microbiológico, como se ha indicado anteriormente.

En los RN prematuros la colonización por microorganismos anaerobios estrictos es más tardía (Magne et al., 2006). Respecto a los clostridios, la colonización varía de un individuo a otro, mientras que los miembros de los géneros *Bacteroides* y *Bifidobacterium* sólo se han aislado o detectado en contadas ocasiones de las heces de estos niños (Campeotto et al., 2011; Jacquot et al., 2011; Rouge et al., 2010). En este estudio, se aislaron bifidobacterias viables y también se detectó su DNA, aunque con una frecuencia baja. Un estudio anterior muestra que la EG tiene un impacto significativo sobre la colonización infantil por las bifidobacterias, ya que estas bacterias solo se detectan en niños nacidos con más de 33 semanas de gestación (Butel et al., 2007). De hecho, algunos autores han demostrado la baja frecuencia relativa y abundancia de bifidobacterias en la microbiota fecal a cualquier edad desde el nacimiento a la edad adulta (Palmer et al., 2007). Estos autores sugirieron que la importancia que se ha dado tradicionalmente a las bifidobacterias en los estudios y revisiones sobre microbiota gastrointestinal infantil puede ser desproporcionada de acuerdo con su prevalencia, abundancia y relevancia para la salud. Este aspecto debería abordarse con mayor profundidad en futuros trabajos.

En general, nuestros resultados indican que el meconio de los RN prematuros alberga una microbiota específica, diferente a la de las heces obtenidas después de la primera semana de vida. Estudios anteriores han demostrado la presencia de una microbiota cultivable similar en la sangre de cordón umbilical y meconio, recogidos en ambiente aséptico, de RN pretérmino y a término. Esto sugiere que el intestino fetal puede no ser estéril antes del parto y que, por lo tanto, al menos una parte de las bacterias que se encuentran en el meconio no tiene un origen postnatal (Ardissone et al., 2014; Jimenez et al., 2008; Mshvildadze et al., 2010; Satokari et al., 2009).

Probablemente, estas bacterias podrían alcanzar el intestino fetal en el útero a través de la deglución de líquido amniótico. Estudios dependientes e independientes de cultivo han revelado que hay bacterias en el líquido amniótico humano sin rotura prematura de membranas (DiGiulio et al., 2008). Anteriormente, se había demostrado que la administración oral de una cepa de enterococos a ratonas gestantes determinaba su presencia tanto en el líquido amniótico obtenido por cesárea como en el meconio (Jimenez et al., 2008). Este hecho no debe sorprender, ya que hace bastantes años se describió que las bacterias del tracto digestivo pueden llegar al líquido amniótico a través de la circulación sanguínea (Kornman y Loesche, 1980). En otro estudio llevado a cabo en mujeres embarazadas se investigó la influencia de la composición de su microbiota oral durante el embarazo (Dasanayake et al., 2005). En él se mostró que algunas bacterias, como por ejemplo *Actinomyces naeslundii*, se asociaron a un menor peso al nacer y a un parto prematuro, mientras que otras, como los lactobacilos, estaban vinculadas a un mayor peso al nacer y partos más tardíos. Los resultados de estos estudios sugirieron que las bacterias orales pueden entrar en el ambiente uterino a través del torrente sanguíneo e influir en el parto (Dasanayake et al., 2005). Entre las bacterias dominantes en las muestras de meconio cabe citar a los estreptococos y los estafilococos, cuya presencia, curiosamente, ya había sido descrita con anterioridad en muestras de corioamnios de madres sanas sometidas a cesárea (Bearfield et al., 2002).

VII.1.1 Microbiota de la alimentación recibida por los recién nacidos prematuros

Uno de los principales factores que tienen una gran influencia en la colonización intestinal de los RN es la alimentación, como se ha indicado anteriormente. No hay duda de que la leche materna es la mejor opción para el crecimiento y el desarrollo de los RN sanos (Agostoni et al., 2009; American Academy of Pediatrics, 2012). En los RN prematuros, aunque la leche materna es igualmente la mejor alternativa, debe fortificarse para cubrir sus necesidades nutritivas especiales. Cuando no se dispone de leche de la propia madre, puede utilizarse leche donada o leche de fórmula (American Academy of Pediatrics, 2012; Arslanoglu et al., 2013). Sin embargo, en la práctica diaria lo habitual suele ser que estos RN prematuros reciban distintos tipos de leche y en distinta cantidad y frecuencia según su disponibilidad, el estado de salud del niño y la organización de la UCIN.

Por otra parte, los RN prematuros deben recibir la alimentación a través de dispositivos o sondas nasogástricas como consecuencia de su falta de coordinación de la succión, la respiración y la deglución, hasta que alcanzan la madurez necesaria para alimentarse directamente del pecho de la madre o de un biberón. Pocos estudios han evaluado el papel de las tubuladuras y las SNG neonatales como un reservorio para la colonización bacteriana y, en consecuencia, su papel como una fuente de bacterias para el intestino de los RN prematuros. Tampoco se ha investigado la posible influencia del régimen de alimentación en el patrón de colonización de dichos dispositivos. Sin embargo, existen estudios que han revelado una presencia constante de estafilococos (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*) y enterobacterias (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cancerogenus*, *E. cloacae*, *E. coli*...) en el interior de la mayoría de las sondas de nutrición enteral analizadas; y, entre estos microorganismos, se incluyen algunos clones que contienen genes de resistencia a

antibióticos, (Hurrell et al., 2009; Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b). Los escasos estudios disponibles hasta el momento habían analizado la parte de la SNG que se introduce en el TGI del RN. Nuestro estudio se centró, por primera vez, en la parte externa de la SNG y la tubuladura, es decir, en partes de estos dispositivos que no están en contacto directo con el RN prematuro. En todas las muestras de leche (de la propia madre, donada y de fórmula) recogidas tras su paso por la tubuladura se pudieron detectar los mismos microorganismos u otros estrechamente relacionados.

El análisis de las superficies internas de la tubuladura y los conectores (partes que conectan la tubuladura con la SNG) mediante microscopía electrónica de barrido reveló la formación de complejas biopelículas microbianas cuando tales dispositivos habían estado colocados durante más de 12 horas. Este hecho se puede atribuir a que las SNG se mantienen a una temperatura constante de 37 °C y pueden llegar a estar colocadas en los niños más de 48 h. Estas biopelículas podrían actuar como un reservorio con condiciones ideales para el crecimiento de patógenos intestinales oportunistas (Hurrell et al., 2009). Además, con el tiempo, se podrían desprender fragmentos de biopelículas envejecidas conteniendo bacterias aglomeradas que, posteriormente, actuarían como un inóculo del alimento fresco que pasa a través del lumen de la sonda. Esto permitiría una mayor multiplicación bacteriana y la reinoculación del intestino del prematuro con la misma microbiota del ambiente hospitalario. Por otro lado, la tubuladura contaminaría la SNG a nivel de los conectores, convirtiéndose en una fuente y depósito adicional de bacterias gastrointestinales del propio huésped. Por lo tanto, no es extraño que la microbiota fecal de los RN prematuros esté dominada frecuentemente por bacterias viables que son habituales en las UCIN, un entorno donde los antibióticos se usan profusamente (Gewolb et al., 1999; LaTuga et al., 2011; Mshvildadze et al., 2010; Schwiertz et al., 2003).

En este estudio, las muestras en las que se encontraron bacterias con mayor frecuencia y en una concentración más alta después de su paso por la tubuladura fueron las correspondientes a la leche de la propia madre. Este es un hallazgo esperado ya que, en la última década, la leche humana ha demostrado ser una fuente natural de bacterias para el intestino del lactante (Fernandez et al., 2013). Además, la leche de la propia madre se administra sin ningún tratamiento después de su recolección o de su almacenamiento en frío, lo cual preserva la diversidad bacteriana de este fluido biológico (Marin et al., 2009). En oposición, otros tipos de muestras sí se someten a un tratamiento térmico antes de su administración. Por un lado, las fórmulas infantiles de un solo uso se esterilizan, mientras que la LMD se pasteuriza, un tratamiento que destruye todas las formas vegetativas bacterianas y tan sólo sobreviven las esporas de *Bacillus* spp. (Gómez de Segura et al., 2012). Por lo tanto, el control de la temperatura y la higiene deben ser exquisitos en el manejo de la LMD pospasteurizada con el fin de evitar posibles contaminaciones o remanentes de esporas.

La principal diferencia observada entre la leche de la propia madre y los otros dos tipos de alimentación fue la frecuencia de aislamiento y concentración de estafilococos (principalmente *S. epidermidis*), que fueron significativamente mayores en las muestras de leche de la propia madre. Los estafilococos constituyen, al menos cuantitativamente, el primer grupo bacteriano que se encuentra en el microbioma de la leche humana (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Ward et al., 2013). Desde hace tiempo, los métodos basados en el cultivo tradicional han revelado que *S. epidermidis*

es la especie más frecuente, tanto en la leche humana como en las heces de los lactantes alimentados con leche materna, si bien está prácticamente ausente en los lactantes alimentados con fórmula (Jimenez et al., 2008). Por lo tanto, esta especie puede ser considerada como un rasgo diferencial de la microbiota fecal de los niños alimentados con leche materna. En oposición, los enterococos, como se había observado en ese trabajo, son muy habituales en las heces infantiles, independientemente del tipo de alimentación (Jimenez et al., 2008). Estudios realizados hace 20 años ya habían descrito que los estafilococos eran comunes en las heces de los lactantes alimentados con leche materna (Balmer y Wharton, 1989; Lundquist et al., 1985; Sakata et al., 1985a). Más recientemente, se ha demostrado que los estafilococos coagulasa-negativos colonizan al 100% de los lactantes alimentados con leche materna en países occidentales desde el tercer día de vida (Adlerberth et al., 2006). Estos estafilococos colonizan al mismo tiempo a RN por parto vaginal y por cesárea. Curiosamente, los estafilococos parecen ser las bacterias con mayor capacidad para utilizar los oligosacáridos de la leche humana (Hunt et al., 2012).

En relación a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, tan sólo se pudieron aislar de un bajo porcentaje de las muestras y, en el caso de las bifidobacterias, sólo cuando la muestra tras el paso por la tubuladura era leche de la propia madre. Estas bacterias también se aíslan o detectan, aunque con menor frecuencia, en la leche humana fresca (Albesharat et al., 2011; Gueimonde et al., 2007; Martin et al., 2003; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009; Perez et al., 2007; Soto et al., 2014). Sin embargo, su prevalencia podría subestimarse tanto cuando se usan técnicas dependientes de cultivo como cuando se aplican técnicas independientes de cultivo. En el primer caso, su aislamiento es, a menudo, más difícil que el de otras bacterias, mientras que en el segundo, los métodos de extracción de DNA y los cebadores utilizados en la actualidad suelen conducir a la amplificación preferencial de las secuencias de DNA de otros grupos bacterianos (Palmer et al., 2007; Turróni et al., 2012). De todos modos, se ha observado que tanto la concentración como la complejidad de las poblaciones de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son significativamente mayores en los RN amamantados que en lactantes alimentados con fórmula (Roger et al., 2010). Un estudio reciente ha revelado que la detección de DNA de lactobacilos o bifidobacterias en muestras de leche cuyas mujeres habían recibido antibioterapia durante el embarazo, el parto o la lactancia, fue significativamente menor (Soto et al., 2014). Se sabe desde hace mucho tiempo que los antibióticos son responsables de los procesos de disbiosis en la microbiota humana, lo que conduce a distintas patologías como la diarrea asociada a antibióticos, gastroenteritis e infecciones orales y urogenitales. En este contexto, hay que tener en cuenta que un porcentaje muy elevado de las mujeres que tienen un parto prematuro suelen recibir antibioterapia.

E. coli, *Klebsiella* spp. y otras enterobacterias, que pueden comportarse tanto como patógenos como comensales, se han detectado ocasionalmente en la leche materna de mujeres sanas (Martin, Heilig et al., 2007b; Perez et al., 2007). Por otra parte, los estudios moleculares han demostrado que estas bacterias se encuentran entre los primeros colonizadores del intestino infantil, donde pueden coexistir con bacterias Gram-positivas (Favier et al., 2002). En estudios previos también se aisló del interior de las SNG de neonatos *Chronobacter sakazakii*, que es una importante preocupación

en las UCIN (Hurrell et al., 2009; Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b). Sin embargo, esta especie no se pudo detectar en esta Tesis Doctoral.

A pesar de las diferencias encontradas en la diversidad y las concentraciones bacterianas, se observó un patrón bacteriano común en los tres tipos de alimentación después de su paso por la tubuladura. Como se dijo anteriormente, esto puede reflejar la contaminación entérica de las SNG a nivel del conector y, también, los restos de bacterias presentes en la leche no tratada térmicamente ya que es habitual administrar al mismo RN y a través de la misma SNG diferentes tipos de leche. Por lo tanto, el protocolo de permanencia de la SNG y tubuladura en los RN prematuros debería ser reconsiderado.

La leche humana, además de microorganismos comensales, contiene una gran cantidad de otros compuestos biológicamente activos, incluyendo agentes antibacterianos, como los anticuerpos maternos, la lactoferrina y la lisozima. Este hecho puede explicar por qué la leche de la propia madre, a pesar de tener una mayor concentración de bacterias en la tubuladura y conectores, también está asociada con un menor número de *Enterobacteriaceae* en las porciones interiores de las SNG en comparación con otros regímenes de alimentación (Hurrell et al., 2009). Este efecto podría contribuir a los efectos beneficiosos para la salud que se asocian con la alimentación con leche materna en prematuros en las UCIN.

Debe señalarse que los perfiles bacterianos descritos en este estudio en el interior de las sondas para la NE y en la alimentación de los prematuros después de su paso a través de la tubuladura fueron muy similares a los encontrados en las muestras de heces. La uniformidad en las comunidades bacterianas en los niños prematuros se puede explicar por la gran influencia que tiene el ambiente hospitalario (Schwiertz et al., 2003). En las UCIN, el temor a sepsis y otras infecciones determina un uso excesivo de antibióticos, y a una edad muy temprana, en los niños ingresados. Esto, a su vez, incrementa el riesgo de colonización con bacterias predominantes en el ambiente hospitalario, en el que son frecuentes las bacterias resistentes a antibióticos. Es decir, en esta situación se podría crear un círculo vicioso responsable de la reducida diversidad bacteriana observada en las muestras de los neonatos prematuros.

VII.1.2 Evolución de la microbiota de los recién nacidos prematuros: seguimiento a los 2 años de edad

La composición de la microbiota intestinal sufre grandes cambios a lo largo de nuestra vida (Harmsen et al., 2000; O'Toole y Claesson, 2010; Woodmansey, 2007). Como se ha comentado al comienzo de este capítulo, el período más dinámico de cambio se ha establecido después del nacimiento, cuando las escasas bacterias presentes intraútero ceden espacio a una comunidad microbiana intestinal compleja. La composición microbiana del colon de los niños nacidos a término está inicialmente dominada por microorganismos anaeróbicos facultativos que, en cuestión de días, generan un ambiente reductor que favorece el desarrollo de bacterias anaerobias estrictas (Fanaro et al., 2003; Mackie et al., 1999). La comunidad bacteriana intestinal del RN caracterizada por una baja diversidad y complejidad bacterianas se desarrolla gradualmente y madura hasta alcanzar un estado adulto perdurable alrededor de los 2-3 años de edad (Koenig et al. 2011; Matamoros et al. 2013). No obstante, el

establecimiento y el desarrollo de la microbiota intestinal en RN prematuros difiere de la de RN a término sanos. La colonización anormal que sufren los RN prematuros en los primeros días de vida puede afectar a la maduración de la barrera epitelial así como las funciones nutricionales e inmunológicas del intestino (Di Mauro et al., 2013; Sharma et al., 2010). De igual modo puede afectar a la composición de la microbiota intestinal posterior, a la edad de 2-3 años de edad.

En esta Tesis Doctoral se comparó la composición bacteriana de meconio y heces de la tercera semana de vida de RN prematuros ingresados en una UCIN (Moles et al., 2013) con la de heces obtenidas de los mismos niños a los dos años de edad. Mientras que en las muestras de meconio y heces de la tercera semana de vida se había constatado una baja diversidad bacteriana y una alta variabilidad interindividual, en las muestras de heces de esos individuos tomadas a los dos años se observó lo contrario. En general, las comunidades bacterianas evolucionaron hacia una microbiota similar a la adulta, con mayor número de especies y menores diferencias interindividuales, como corresponde al desarrollo normal de la microbiota de niños sanos nacidos a término a medida que crecen (Palmer et al., 2007). Aquellos géneros de bacterias relacionados con el ambiente hospitalario, como *E. coli*, *Klebsiella* o *Serratia*, que se encontraban presentes en las muestras fecales de los niños ingresados en la UCIN, habían sido reemplazados al cabo de dos años por géneros bacterianos pertenecientes a los grupos IV y XIVa de *Clostridium*. El predominio de estos grupos bacterianos es un aspecto distintivo de enterotipos adultos caracterizados por una microbiota compleja con un lento reemplazo, un bajo potencial redox y una producción relativamente alta de ácidos grasos de cadena corta (Hao y Lee, 2004).

Como se ha mencionado previamente, la diversidad bacteriana intestinal de los niños prematuros aumentó con la edad, de acuerdo con lo descrito por otros autores en distintas poblaciones (Yatsunen et al., 2012). Además, al comparar los datos obtenidos en esta Tesis Doctoral con los almacenados en la base de datos de la micromatriz de DNA utilizada (HITChip) se observó que la diversidad bacteriana presente en las heces de niños nacidos prematuros a los 2 años de edad era similar a la de niños sanos de 2 - 4 años e inferior a la de adultos. El patrón de colonización intestinal va sufriendo cambios notables hasta los 2 o 3 años de vida, momento en el que la microbiota se estabiliza y comienza a parecerse a la de la edad adulta (Koenig et al., 2011; Wilks, 2007). Sin embargo, en este estudio, la diversidad de la microbiota intestinal en los niños prematuros a los 2 años no ha alcanzado todavía los atributos de la microbiota adulta.

El tratamiento con antibióticos retrasa o impide la colonización con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Bennet et al., 2002; Gewolb et al., 1999; Penders et al., 2006). Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que esto puede ser un efecto a largo plazo de la prematuridad, ya que, a los dos años de edad, la abundancia relativa de las bifidobacterias seguía siendo baja, incluso ausente en el caso de los lactobacilos.

Hay evidencias de que la colonización microbiana intestinal y la resultante programación metabólica e inmunológica pueden tener una influencia duradera sobre el riesgo de enfermedades futuras (Matamoros et al., 2013). Aunque aún se desconoce cómo influye la microbiota intestinal sobre el sistema inmunitario y cómo afecta la colonización inicial del intestino en la maduración inmunitaria (Johansson et al., 2012), sobretodo en RN prematuros (Jacquot et al., 2011). Diversos estudios han

descrito componentes inmunológicos en saliva, sangre de cordón umbilical o sangre periférica de RN a término y prematuros (Blanco-Quiros et al., 2000; Johansson et al., 2012; Lusyati et al., 2013; Matoba et al., 2009; Sjogren et al., 2009; Wan et al., 2003) mostrando perfiles inmunológicos distintos en función de la EG. Sin embargo, muy pocos autores han investigado la presencia de citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas en heces de RN prematuros (Mohan et al., 2008; Richter et al., 2010; Westerbeek et al., 2011). Es por ello que en esta Tesis Doctoral se ha analizado la presencia de una amplia gama de componentes inmunológicos en meconio y heces de RN prematuros y heces de estos mismos niños a los 2 años de edad, siendo este el primer estudio conocido que persigue este objetivo. Resulta interesante que cada tipo de muestra analizada (meconio, heces de la primera y tercera semana de vida y heces a los dos años de edad) mostrara un perfil de expresión de componentes inmunológicos diferencial, aunque no se pudo identificar ningún componente en particular que cambiase significativamente entre las muestras tomadas en distintos tiempos.

Una respuesta notable del sistema inmunitario, consecuencia de la colonización bacteriana intestinal tras el nacimiento, es la producción de IgA por parte del tejido linfóide asociado al intestino (Suzuki et al., 2007). Este hecho explicaría el notable incremento observado en la concentración de IgA en las muestras de heces obtenidas en la primera semana tras el nacimiento en comparación con la detectada en el meconio de los RN prematuros. Por otra parte, las glándulas mamarias lactantes forman parte del sistema inmunitario secretor y la presencia de anticuerpos del tipo IgA en la leche materna refleja la estimulación antigénica de la mucosa asociada a tejido linfóide (Brandtzaeg, 2010). Los anticuerpos de la leche materna son, por lo tanto, muy específicos contra los agentes infecciosos y otros antígenos exógenos en el entorno de la madre, que son los primeros que entran en contacto con el neonato (Mohan et al., 2008). Por lo tanto, la lactancia materna representa una integración inmunitaria perfecta entre madre e hijo (Brandtzaeg, 2010; Castellote et al., 2011; Garofalo, 2010; Tomicic et al., 2010). Este hecho pone de manifiesto la importancia de la disponibilidad de la leche de la propia madre o de donantes para alimentar a los RN prematuros, una población que como ya se ha descrito es especialmente sensible a las enfermedades infecciosas e inflamatorias. Cabe señalar que una colonización microbiana intestinal anormal predispone al intestino del RN prematuro a la inflamación y a la activación de las cascadas de citoquinas pro- y antiinflamatorias (Mai et al., 2013). La capacidad de IgA para penetrar en la superficie de la mucosa intestinal en conjunción con antígenos, y como consecuencia, inducir respuestas inmunitarias efectoras, desempeña un papel clave en el mantenimiento de la microbiota intestinal y la homeostasis inmunitaria (Rogosch et al., 2012).

VII.2 *KLEBSIELLAS* SPP.: DE COMENSAL A PATÓGENO OPORTUNISTA

Las *klebsiellas* colonizan con frecuencia el tracto gastrointestinal de individuos sanos, donde pueden alcanzar una concentración de hasta 10^7 unidades formadoras de colonias (ufc)/g en las heces (Adlerberth y Wold, 2009; Leclerc et al., 2001). Así mismo, se pueden aislar ocasionalmente de leche de mujeres sanas, aunque a una concentración notablemente inferior ($<10^3$ ufc/ml) (Jimenez et al., 2008c; Martin et al., 2007b). Su aislamiento o detección en muestras de leche y heces obtenidas de mujeres y niños residentes en países muy distantes entre sí sugiere que su presencia no es el resultado de una mera contaminación ocasional, sino que realmente forman parte de la microbiota natural de esos sustratos. El hecho de que colonicen a un gran porcentaje de niños lactantes sin que desarrollen ningún tipo de sintomatología sugiere que estas bacterias no son patógenas *per se*. Es más, podrían jugar un papel esencial en el intestino infantil, evitando la colonización por parte de enterobacterias potencialmente patógenas. Sin embargo, también es cierto que las *klebsiellas* están implicadas en procesos infecciosos en pacientes pediátricos, con una creciente aparición de cepas resistentes a los antibióticos. Actualmente, no existen marcadores que permitan discriminar entre las cepas comensales y aquellas potencialmente patógenas (Little et al., 2014).

Tradicionalmente la identificación de aislados bacterianos se ha llevado a cabo mediante pruebas bioquímicas; sin embargo, los resultados de dichas pruebas suelen ser insuficientes para la asignación de un aislado a una especie determinada. Desde el punto de vista de la microbiología clínica ha existido un interés creciente por el desarrollo de métodos de identificación bacteriana que permitan la identificación rápida y precisa de aquellas especies frecuentemente implicadas en procesos patológicos.

La correcta identificación de los aislados del género *Klebsiella* es muy importante, tanto desde un punto de vista epidemiológico como clínico. El desarrollo de herramientas moleculares, como la secuenciación del gen que codifica la fracción 16S del RNA ribosómico ha permitido mejorar la taxonomía bacteriana, incluyendo la del género en cuestión (Boye y Hansen, 2003; Mahlen y Clarridge, 2011). Sin embargo, la variabilidad en la secuencia de nucleótidos de dicho gen es pequeña entre las distintas especies de *Klebsiella*, lo que complica la identificación a nivel de especie y propicia, en muchas ocasiones, la clasificación errónea de los aislados (Hansen et al., 2004). La aparición de nuevos marcadores moleculares, como el gen *rpoB* (Drancourt et al., 2001) o los genes *gyrA* y *parC* (Brisse y Verhoef, 2001), ha facilitado la identificación de los aislados en los casos en los que la secuenciación del gen 16S rRNA es poco concluyente.

En esta Tesis Doctoral, la amplificación y posterior secuenciación parcial de un fragmento de 454 pb de una región variable del gen *rpoB* que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa bacteriana, ha permitido identificar un alto porcentaje de los aislados de *Klebsiella* obtenidos de niños sanos, neonatos durante un brote en una UCIN y adultos hospitalizados. Sin embargo, las diferencias en esta secuencia no fueron suficientes para discriminar entre las especies *Raoultella ornithinolytica* y *Raoultella planticola*, por lo que se requirió realizar la prueba de descarboxilación de

la ornitina para la identificación de los aislados pertenecientes a dichas especies (Alves et al., 2006; Hansen et al., 2004).

El análisis filogenético de las cepas de *K. pneumoniae* basado en el gen *rpoB*, es un método de referencia para el estudio filogenético de este género (Alves et al., 2006) y su aplicación en esta Tesis Doctoral permitió clasificar los aislados en 3 grupos. Así, el 94% de los aislados de *K. pneumoniae* formaron parte del grupo KpI, el 3% del KpII-A y otro 3% del KpII-B. El predominio de los aislados de tipo KpI ya se había descrito con anterioridad (Alves et al., 2006; Brisse et al., 2004). Las especies de *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* y *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* parecen estar estrechamente relacionadas con *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* en el árbol filogenético, también de acuerdo con estudios anteriores (Brisse y Verhoef, 2001; Drancourt et al., 2001).

Con relación a las cepas de *K. oxytoca*, el análisis filogenético basado en el gen *rpoB* clasificó nuestros aislados en tres grupos: KoI (85%), KoII (5%) y KoVI (10%). Por otra parte, tan sólo se identificó un aislado de *K. variicola* (K12-3) que, junto con *K. variicola* F2R9T, pertenecía al grupo KpIII lo que confirma la relación entre este grupo filogenético (KpIII) y la citada especie (Alves et al., 2006; Rosenblueth et al., 2004).

El árbol filogenético realizado con todas las secuencias obtenidas permitió la separación de las especies *K. pneumoniae*, *K. variicola*, *K. oxytoca* y *R. planticola* en grupos claramente definidos. Por lo tanto, el análisis filogenético basado en la secuenciación del gen *rpoB* tiene poder discriminante para separar estas especies, tal y como han observado otros autores (Alves et al., 2006; Brisse y Verhoef, 2001).

Existe una alta diversidad genética entre los aislados comensales y los causantes de bacteriemias, mientras que entre los aislados de la UCIN se aprecia una fuerte diseminación clonal. Por lo tanto, para la caracterización de dichos clones es importante realizar un estudio a nivel de cepa.

En esta Tesis Doctoral, la identificación de los aislados a nivel de cepa se llevó a cabo mediante dos técnicas: RAPD y PFGE. El RAPD es una técnica molecular rápida y sencilla que permite diferenciar cepas dentro de una misma especie. Sin embargo, su reproducibilidad es menor que la del PFGE y los resultados obtenidos en distintos laboratorios son difícilmente comparables (van Belkum et al., 2001). De hecho, algunas de las cepas que presentaron un mismo perfil de RAPD resultaron ser distintas al aplicar la técnica PFGE, como HV2-11 y HV1-11 en el caso de *K. pneumoniae* o K12-5 y K12-7 en el de *K. oxytoca*. Este hecho ha sido descrito previamente por otros autores (Drevinek et al., 2005; Johnson et al., 2006; van den Braak et al., 2000). Por ello, se eligió la técnica PFGE para la discriminación final entre los aislados. En el caso de *Klebsiella* spp., las enzimas de restricción habitualmente empleadas en aislados clínicos procedentes de brotes hospitalarios son *HaeIII*, *XbaI* y *SpeI* (Brisse et al., 2006). En este estudio, se utilizó la enzima *XbaI*, comprobando que la mayoría de los aislados pertenecientes a una misma especie eran distintas, excepto ocho: cuatro clones de *K. pneumoniae* procedentes del ámbito hospitalario y cuatro de *K. oxytoca* aisladas de heces de lactantes sanos. Los primeros se obtuvieron durante un mismo periodo de tiempo, coincidente con un brote en una unidad neonatal y, de hecho, se consideraron como los agentes etiológicos del mismo.

Las infecciones son la primera causa de muerte neonatal en los países desarrollados. Algunas de ellas se originan por transmisión vertical madre-hijo pero la mayoría son de origen nosocomial. En las últimas décadas ha aumentado la administración de algunos antibióticos para combatir las infecciones bacterianas, especialmente en las UCIs. Como consecuencia, los microorganismos son más resistentes a ciertos antimicrobianos, como los antibióticos β -lactámicos. Los microorganismos productores de BLEEs, entre los que destaca *K. pneumoniae* (Pitout et al., 2005), siempre se han asociado con brotes nosocomiales, principalmente en UCIs. La producción de BLEEs tiene un gran impacto en la supervivencia de los RN infectados por *Klebsiella* spp. (Kristóf et al., 2007). Esta fue una de las razones por las que en esta Tesis Doctoral se ha estudiado la posible producción de BLEEs por las cepas de *Klebsiella*.

La producción de BLEEs en *K. pneumoniae* es compleja, predominando las enzimas CTX-M sobre otras familias de BLEEs (Valverde et al., 2008). Además, los aislados con las enzimas CTX-M son más resistentes a diferentes antibióticos que los que producen otro tipo de BLEEs. Como se ha observado en esta Tesis Doctoral, de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas durante la aparición de un brote hospitalario en una UCIN durante 2007, el 60% poseía la enzima CTX-M-15. Esta enzima se detectó en *K. pneumoniae* un año después de su primera descripción (Canton y Coque, 2006) y se ha relacionado con brotes en UCIN en otros países (Rettedal et al., 2012). En nuestros aislados sólo se detectaron BLEEs de la familia CTX-M, lo cual no es de extrañar ya que es una de las familias más comunes, junto a TEM y SHV. Estas enzimas confieren resistencia a ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxoma, aztreonam y otros oximino- β -lactámicos.

Todos los aislados que presentaron CTX-M-15 fueron sensibles a imipenem excepto *K. pneumoniae* K12-9 (MIC >8 μ g/ml). Este hecho es muy importante desde el punto de vista clínico, ya que el imipenem se ha propuesto como el tratamiento antibiótico de elección para controlar las infecciones producidas por *Klebsiella* o *E. coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (Jacoby y Munoz-Price, 2005; Maherault et al., 2012; Ramphal y Ambrose, 2006).

Al igual que *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* es una especie bacteriana frecuente en las UCIN. Sin embargo, la producción de BLEEs es más frecuente entre los aislados de la primera especie. De hecho, en este estudio sólo una cepa de *K. oxytoca* presentaba la enzima CTX-M-15. Previamente, otros autores aislaron una cepa de *K. oxytoca* productora de BLEEs en niños con infección aunque, en su caso, presentaba la enzima SHV-5 (Kristóf et al., 2007).

En principio parecería lógico que las cepas aisladas del ámbito hospitalario presentaran más genes de virulencia que las aisladas de individuos sanos. Sin embargo, en este estudio no se observaron diferencias destacables entre los aislados analizados. Previamente, Podschun et al. (2001) tampoco encontraron diferencias en la expresión de determinados factores de virulencia entre cepas de *K. pneumoniae*, independientemente de que tuvieran un origen ambiental o clínico.

Existen dos genes relacionados con el fenotipo de hiper mucoviscosidad, el gen asociado a la mucoviscosidad (*magA*) y el gen regulador del fenotipo mucoide (*rmpA*) (Hsu et al., 2011; Yu et al., 2006). Entre nuestros aislados de *K. pneumoniae* no se detectó en ningún caso el *magA*. Ambos genes se han detectado en cepas implicadas en

casos de abscesos hepáticos en EEUU (Fierer et al., 2011; Nadasy et al., 2007) y Taiwan (Fang et al., 2004). En este último estudio no se apreció una asociación inequívoca entre el fenotipo de hipermucoviscosidad y la presencia de estos dos genes, aunque sí se observó una mayor incidencia de la presencia de los genes y el fenotipo de hipermucoviscosidad en los casos de abscesos hepáticos que en los que no presentaban esta patología. Algunos autores han encontrado mayor prevalencia de los serotipos K1 y K2 en los aislados de *K. pneumoniae* procedentes de abscesos hepáticos que en los provenientes de bacteriemia (Tsay et al., 2002; Yeh et al., 2007). Por ello, se ha sugerido que las cepas de los citados serotipos podrían ser más resistentes a la fagocitosis y más virulentas que las demás (Yeh et al., 2006). En cualquier caso, los estudios sobre abscesos hepáticos causados por *K. pneumoniae* son muy escasos en nuestro país (Gomez et al., 2007). Por otra parte, se ha observado que la presencia del gen *magA*, más que un indicativo de virulencia, es una buena herramienta molecular para determinar el serotipo capsular, ya que todas las klebsiellas del serotipo K1 lo presentan (Chuang et al., 2006).

Todas las cepas de *K. pneumoniae* y *K. variicola* presentaron el gen *fimH* que codifica la porción adhesina de la fimbria tipo 1, que está implicada en los procesos de adhesión y de formación de biopelículas. La presencia de dicho gen parece ser una característica común a los aislados de *K. pneumoniae* (Brisse et al., 2009; Yu et al., 2006).

Los genes *wabG* (que codifica proteínas implicadas en la síntesis de LPS) (Izquierdo et al., 2003) y *uge* (que codifica la uridina difosfato galacturonato 4-epimerasa, implicada en la formación de la cápsula) estaban presentes en todas las cepas aisladas a partir de heces, pero sólo se detectaron en un pequeño porcentaje de las cepas aisladas de otras fuentes. Las cepas más virulentas de *K. pneumoniae* (Brisse et al., 2009) y las cepas aisladas de pacientes con bacteriemia (Yu et al., 2006) suelen contener ambos genes, por lo que es posible que desempeñen un papel relevante en la virulencia. De hecho, los mutantes sin cápsula y sin la porción externa del LPS pierden gran parte de su virulencia, incluyendo la capacidad para la producción de infecciones en el tracto urinario (Brisse et al., 2009; Yu et al., 2006).

Un requisito previo para que una bacteria patógena produzca infección es su adaptación para captar nutrientes que, como el hierro, posibilitan su crecimiento dentro del hospedador. Además, la capacidad de captar e incorporar hierro resulta crítica para la patogénesis, ya que actúa como un cofactor en los componentes de defensa de la bacteria al estrés oxidativo, como son las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa. Por estas razones las bacterias han desarrollado sistemas de captación de hierro entre los que se encuentran los sideróforos.

Los tres sideróforos más comunes en la familia *Enterobacteriaceae* son la enterobactina, la aerobactina y la yersiniabactina (Lawlor et al., 2007). Varios autores han estudiado la distribución de sideróforos entre aislados clínicos de *K. pneumoniae*, siendo el más frecuente la enterobactina, que está presente en casi todos los aislados estudiados hasta la fecha (El Fertas-Aissani et al., 2013; Koczura y Kaznowski, 2003; Podschun et al., 1992; Schubert et al., 2000). De forma similar, en esta Tesis Doctoral el sideróforo más prevalente entre los aislados de *K. pneumoniae* fue la enterobactina, seguido de la yersiniabactina. Un 9% de cepas presentaron los genes que codifican dos sideróforos, la enterobactina y la yersibactina. En un estudio reciente, utilizando un modelo de infección intraperitoneal por *E. coli*, se ha demostrado que la proteína

lipocalin 2 de los mamíferos puede intervenir secuestrando la enterobactina, inhibiendo el crecimiento bacteriano *in vivo* (Flo et al., 2004). En este mismo contexto, todo parece indicar que se requieren otros sistemas de adquisición de hierro, aparte de la enterobactina, para la colonización de la mucosa nasal (Lawlor et al., 2007). Por lo tanto, la adquisición de sistemas de sideróforos adicionales al de la enterobactina, puede ser un factor clave para potenciar la virulencia de las cepas de *K. pneumoniae* (Lawlor et al., 2007). Este hecho podría explicar la existencia de cepas de *Klebsiella* que presentan simultáneamente los genes de la enterobactina y de la aerobactina.

Aparte de los sideróforos, las bacterias pueden presentar otros sistemas de captación de hierro, como el sistema Kfu de *K. pneumoniae*. El gen *kfu* codifica una proteína periplásmica que capta el hierro pero no es un sideróforo. En un estudio reciente, se observó que el operón *kfu* estaba presente en la mayor parte de las cepas de *K. pneumoniae* invasoras de tejidos y ausente en la mayoría de las cepas no invasoras (Fang et al., 2004). En esta Tesis Doctoral se pudo determinar la presencia del gen *kfu* en un 15% de las cepas estudiadas, aunque no se observó relación alguna entre la presencia de dicho gen y el origen de los aislados.

En esta Tesis Doctoral, también se estudió la capacidad de las cepas de *Klebsiella* para producir compuestos antimicrobianos tanto en medio sólido como líquido. De todos los aislados del estudio, dos cepas de *K. pneumoniae* (MV91-1 y Kp5) fueron capaces de producir compuestos antimicrobianos contra otras cepas de *Klebsiella* cuando se realizó un ensayo en medio sólido. La actividad inhibidora de ambas cepas fue sensible a la proteinasa K, lo que sugiere que dicha actividad está mediada por la producción de bacteriocinas. Las bacteriocinas constituyen el sistema de defensa antimicrobiano más abundante y diverso entre las bacterias. En el género *Klebsiella* también se han descrito cuatro bacteriocinas, que se conocen como klebicinas: klebicina B (Riley et al., 2001), klebicinas C y D (Chavan et al., 2005) y klebicina CCL (NCBI acceso AF190857).

El espectro inhibidor de la sustancia antimicrobiana tipo bacteriocina producida por *K. pneumoniae* MV91-1 era más amplio que el de la sintetizada por *K. pneumoniae* Kp5; no obstante, ambas bacteriocinas fueron activas contra las cepas *K. oxytoca* y *K. pneumoniae* aisladas en el brote nosocomial de la UCIN, incluyendo la cepa de *K. pneumoniae* K12-9 resistente a imipenem. Este hecho pone de manifiesto el papel que pueden jugar las klebsiellas comensales para impedir la colonización o la proliferación de las patógenas en un hospedador.

VII.3 PREVENCIÓN DE INFECCIONES EN NIÑOS PREMATUROS MEDIANTE LA MODULACIÓN DE LA MICROBIOTA MATERNO-INFANTIL: DE LOS PROBIÓTICOS A LAS MICROBIOTAS SINTÉTICAS

En los últimos años, se ha constatado que la microbiota intestinal de los niños prematuros presenta ciertas características que la diferencian claramente de la de los nacidos a término. Entre ellas, destacan dos: (a) una menor diversidad, lo que supone la pérdida de funciones metabólicas, inmunológicas y de barrera, que son particularmente relevantes en esa época de la vida; y (b) un dominio abrumador de microorganismos del ámbito hospitalario que, de este modo, tienen fácil acceso a un hospedador particularmente predispuesto a padecer infecciones. En consecuencia, existe un creciente interés en el desarrollo de estrategias que permitan modular el proceso de establecimiento de la microbiota en los neonatos prematuros. Para desarrollar con éxito tales estrategias, resulta fundamental un conocimiento detallado de la microbiota y del microbioma de la pareja madre-hijo y, también, del proceso de establecimiento de la microbiota intestinal en estos niños.

Una de las estrategias podría ser la aplicación de probióticos específicamente seleccionados para dicha población. Los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor (Reid, 2001). Es importante señalar que las propiedades probióticas dependen de cada cepa; es decir, cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, no se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Además, la adscripción de un efecto probiótico de una cepa depende, entre otros factores, de la dosis (típicamente $>10^8$ ufc ml^{-1} o g^{-1}), forma de administración, sistema de producción y condiciones de almacenamiento (Shortt, 1999).

La administración de probióticos por vía enteral podría jugar un papel relevante en la reducción de la mortalidad y la morbilidad asociada a las infecciones neonatales mediante la prevención de la migración bacteriana a través de las mucosas, la exclusión competitiva de bacterias potencialmente patógenas y la mejora de la respuesta inmunitaria del huésped. Hasta el momento, el número de estudios sobre los efectos de los probióticos en niños prematuros es relativamente bajo pero ha empezado a subir rápidamente en los dos últimos años. Todos ellos han demostrado que son seguros; hecho muy relevante ya que la administración de bacterias vivas a niños que *a priori* están muy inmunodeprimidos, siempre había despertado recelo, preocupación e incluso rechazo; adicionalmente, la mayoría de los estudios ha mostrado que algunas cepas probióticas pueden ser eficaces para la prevención de la NEC y/o de las sepsis en esta población (Chen et al., 2014; Garland et al., 2011; Jacobs et al., 2013; Oncel et al., 2014; Patole et al., 2014; Wang et al., 2012). Todos los meta-análisis publicados recientemente han puesto en evidencia un impacto positivo significativo sobre diversos parámetros clínicos (Janvier et al., 2014). En un meta-análisis que incluía 24 ensayos, se observó una disminución significativa de la incidencia de NEC y de la mortalidad por cualquier causa (AlFaleh et al., 2011).

Por otra parte, la ingestión de suplementos nutricionales con probióticos durante el último trimestre del embarazo tiene un efecto modulador de la microbiota y la secreción de citoquinas en el ecosistema vaginal, hecho que podría tener posibles

implicaciones dentro de las estrategias futuras para la prevención del parto prematuro (Vitali et al., 2012). En este mismo sentido, también existen indicios de que la administración de bacterias probióticas a la madre durante el posparto podría contribuir a disminuir la incidencia de NEC en los lactantes alimentados con leche materna (Benor et al., 2013). Recientemente, se ha demostrado que el sobrenadante obtenido a partir del cultivo de una cepa probiótica impide el PPT inducido por lipopolisacárido y reduce la inflamación en ratonas gestantes (Yang et al., 2014).

Actualmente, el trasplante o transferencia fecal (o “*bacterioterapia fecal*”) como método para modificar ecosistemas microbianos complejos en situaciones patológicas ha despertado un gran interés. Consiste en administrar una suspensión de heces obtenida de una persona sana a otra persona mediante sonda, colonoscopia o enema. Es decir, se transfiere la microbiota intestinal de una persona a otra, incluyendo no sólo los microorganismos cultivables sino también los que actualmente no se pueden cultivar y que, en consecuencia, no se pueden administrar en forma de un probiótico convencional. Realmente, se trata de un proceso natural que ocurre en la vida temprana, por ejemplo, durante el tránsito por el canal del parto, y que se ha practicado de forma empírica desde hace miles de años. La principal razón para la popularidad de los trasplantes fecales es la eficacia tan elevada que muestra en el tratamiento de ciertas enfermedades muy difíciles de controlar y, especialmente, en la infección recurrente por *Clostridium difficile* (Bakken et al., 2011; Gough et al., 2011; van Nood et al., 2013). Igualmente, se ha descrito el éxito del trasplante fecal para el tratamiento de infecciones infantiles causadas por microorganismos resistentes a los antibióticos (de Vos, 2013).

Sin embargo, el trasplante fecal se enfrenta a problemas prácticos importantes, derivados de la extraordinaria complejidad microbiológica, inmunológica y bioquímica de las heces, cuya composición puede variar incluso dentro de una misma persona, dependiendo de numerosos factores. Por ejemplo, las heces podrían convertirse en fuente de sustancias nocivas o de microorganismos que puedan representar un problema para la salud a medio y largo plazo. Por otro lado, se trata de una muestra biológica que es imposible de estandarizar, lo que limita su aplicación a gran escala. Por lo tanto, existe la necesidad de diseñar y desarrollar nuevos procesos biotecnológicos que permitan aplicar el principio de la transferencia fecal de una forma reproducible.

En este sentido, el concepto de comunidades microbianas sintéticas, específicas para un nicho concreto, puede abrir nuevas vías terapéuticas para modificar la microbiota intestinal de personas con diversas patologías (Allen-Vercor et al., 2012; de Vos, 2013). Recientemente, se ha descrito la eficacia de un sustituto de la microbiota intestinal, elaborado a partir de los cultivos puros de 33 especies bacterianas aisladas de heces de un único donante sano, para tratar casos de infección recurrente por *C. difficile* en los que la antibioterapia había fracasado (Petrof et al., 2013). Este estudio pionero demostró, por primera vez, que una microbiota mínima diseñada en el laboratorio es capaz de curar infecciones resistentes a los antibióticos.

Las ventajas de las comunidades microbianas sintéticas son fácilmente perceptibles ya que permiten: (a) controlar la composición de las mezclas sintéticas; (2) garantizar la ausencia de sustancias nocivas y patógenos, incluyendo virus; y (c) fabricación a escala industrial y de forma reproducible mediante procesos biotecnológicos. De hecho, la producción aséptica de mezclas de cepas viables (bien

liofilizadas o congeladas) en fermentadores industriales es una tecnología bien conocida que se emplea en la producción de cultivos iniciadores o probióticos. La implementación de estas comunidades microbianas sintéticas en terapias de última generación sería de gran beneficio para los pacientes y, además, permitiría avanzar en nuestra comprensión del microbioma intestinal humano. Serán necesarios muchos estudios para definir las funciones que deben desempeñar los componentes de un microbioma sintético para la prevención o el tratamiento de las infecciones en los prematuros. En cualquier caso, el desarrollo de comunidades bacterianas definidas, representativas de las que existen en leche humana o en las heces de los lactantes en condiciones fisiológicas, supone un enfoque atractivo para la prevención y el tratamiento de infecciones en la población prematura en el contexto de la creciente aparición de bacterias patógenas multirresistentes.

VIII. CONCLUSIONES



VII. CONCLUSIONS

Las conclusiones obtenidas en este trabajo de investigación son las siguientes:

Primera. La microbiota fecal de los niños prematuros posee un marcado carácter individual y muestra fluctuaciones durante las primeras semanas de vida. En general, la microbiota fecal de estos niños está dominada por bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Escherichia*. Por otro lado, la colonización con lactobacilos y bifidobacterias parece ser muy baja durante el periodo de hospitalización.

First. The fecal microbiota of preterm infants shows a high degree of interindividual variability and is characterized by sharp fluctuations during the first weeks of life. In general, it is less diverse than that of term infants and is dominated by hospital-associated bacteria, including those belonging to the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Escherichia*. Furthermore, colonization by lactobacilli and bifidobacteria seems to be very low during the period of hospitalization.

Segunda. Globalmente, estos hechos pueden reflejar la estancia prolongada de los niños en unidades neonatales caracterizadas por una elevada prevalencia de microorganismos propios del ambiente hospitalario, como son los pertenecientes a los géneros citados anteriormente. Las sondas de alimentación enteral pueden ser una fuente de bacterias para la colonización del tracto gastrointestinal de los recién nacidos prematuros.

Second. Overall, these events may reflect the prolonged stay of infants in neonatal units characterized by a high prevalence of hospital environment microorganisms, such as those belonging to the genera mentioned above. The enteral feeding systems may contribute to the persistence of such bacteria in the preterm gastrointestinal tract.

Tercera. La diversidad de la microbiota fecal de los niños que nacieron prematuramente aumenta cuando cumplen dos años equiparándose a los valores descritos a esa misma edad para los niños que nacieron a término. Globalmente, se observa una sustitución de algunas de las bacterias asociadas al ambiente hospitalario por otras que son características de la microbiota de los adultos sanos.

Third. The diversity of the fecal microbiota of the infants that were born prematurely increases when they are 2-year-old reaching the values described at the same age for children born at term. Globally, there is a substitution of some of the hospital-associated bacteria by other bacteria that are typically associated to the gut microbiota of healthy adults.

Cuarta. La secuenciación del gen *rpoB* es una herramienta útil para la identificación a nivel de especie de los aislados pertenecientes al género *Klebsiella*. Las pruebas fenotípicas y genotípicas disponibles en la actualidad no permiten diferenciar claramente las cepas comensales de las potencialmente patógenas. No obstante, la multirresistencia a antibióticos clínicamente relevantes puede explicar el fracaso terapéutico en hospedadores que, como sucede en el caso de los niños prematuros, son especialmente sensibles a las infecciones.

Fourth. The sequencing of the *rpoB* gene is a valuable tool for the identification, at the species level, of those isolates belonging to the genus *Klebsiella*. The phenotypic and genotypic tools available at present do not allow a clear differentiation between commensal and potentially pathogenic strains. However, antibiotic multiresistance may explain the therapeutic failure in those hosts that are particularly vulnerable to infections, such as preterm infants.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aarnoudse-Moens, C. S., Weisglas-Kuperus, N., van Goudoever, J. B. & Oosterlaan, J. (2009). Meta-analysis of neurobehavioral outcomes in very preterm and/or very low birth weight children. *Pediatrics*, 124(2), 717-728.
- Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 131-144.
- Adlerberth, I., Lindberg, E., Aberg, N., Hesselmar, B., Saalman, R., Strannegard, I. L., et al. (2006). Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: An effect of hygienic lifestyle? *Pediatric Research*, 59(1), 96-101.
- Adlerberth, I. & Wold, A. E. (2009). Establishment of the gut microbiota in western infants. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway: 1992)*, 98(2), 229-238.
- Agbla, F., Ergin, A. & Boris, N. (2006). Occupational working conditions as risk factors for preterm birth in Benin, West Africa. *Revue D'Epidemiologie Et De Sante Publique*, 54(2), 157-165.
- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K. F., et al. (2009). Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(1), 112-125.
- Al-Asmakh, M., Anuar, F., Zadjali, F., Rafter, J. & Pettersson, S. (2012). Gut microbial communities modulating brain development and function. *Gut Microbes*, 3(4), 366-373.
- Albesharat, R., Ehrmann, M. A., Korakli, M., Yazaji, S. & Vogel, R. F. (2011). Phenotypic and genotypic analyses of lactic acid bacteria in local fermented food, breast milk and faeces of mothers and their babies. *Systematic and Applied Microbiology*, 34(2), 148-155.
- Alexander, G. R., Kogan, M., Bader, D., Carlo, W., Allen, M. & Mor, J. (2003). US birth weight/gestational age-specific neonatal mortality: 1995-1997 rates for whites, hispanics, and blacks. *Pediatrics*, 111(1), e61-6.
- AlFaleh, K., Anabrees, J., Bassler, D. & Al-Kharfi, T. (2011). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), CD008991.
- Alfirevic, Z., Stampalija, T., Roberts, D. & Jorgensen, A. L. (2012). Cervical stitch (cerclage) for preventing preterm birth in singleton pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*, 4, CD008991.
- Ali, G. Y., Algohary, E. H., Rashed, K. A., Almoghanum, M. & Khalifa, A. A. (2012). Prevalence of *Candida* colonization in preterm newborns and VLBW in neonatal intensive care unit: Role of maternal colonization as a risk factor in transmission of disease. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine : The Official Journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians*, 25(6), 789-795.
- Allen-Vercoe, E., Reid, G., Viner, N., Gloor, G. B., Hota, S., Kim, P., et al. (2012). A canadian working group report on fecal microbial therapy: Microbial ecosystems therapeutics. *Canadian Journal of Gastroenterology (Journal Canadien De Gastroenterologie)*, 26(7), 457-462.
- Altman, M., Vanpee, M., Cnattingius, S. & Norman, M. (2011). Neonatal morbidity in moderately preterm infants: A swedish national population-based study. *The Journal of Pediatrics*, 158(2), 239-44.
- Alves, M. S., Dias, R. C. d. S., de Castro, A. C. D., Riley, L. W. & Moreira, B. M. (2006). Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-

- negative *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(10), 3640-3646.
- Amarri, S., Benatti, F., Callegari, M. L., Sha Bennet khkhalili, Y., Chauffard, F., Rochat, F., et al. (2006). Changes of gut microbiota and immune markers during the complementary feeding period in healthy breast-fed infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 42(5), 488-495.
- American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), e827-41.
- Ananth, C. V., Getahun, D., Peltier, M. R., Salihu, H. M. & Vintzileos, A. M. (2006). Recurrence of spontaneous versus medically indicated preterm birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(3), 643-650.
- Arbolea, S., Binetti, A., Salazar, N., Fernández, N., Solís, G., Hernández-Barranco, A., et al. (2012). Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiology Ecology*, 79(3), 763-772.
- Ardisson, A. N., Diemel, M., Davis-Richardson, A. G., Rechcigl, K. T., Li, N., Drew, J. C., et al. (2014a). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS One*, 9(3), e90784.
- Ardisson, A. N., de la Cruz, D. M., Davis-Richardson, A. G., Rechcigl, K. T., Li, N., Drew, J. C., et al. (2014b). Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PloS One*, 9(3), e90784.
- Ariffin, H., Navaratnam, P., Mohamed, M., Arasu, A., Abdullah, W. A., Lee, C. L., et al. (2000). Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection in children with febrile neutropenia. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 4(1), 21-25.
- Arnold, L. (2002). Using banked donor milk in clinical settings. *Reclaiming Breastfeeding for the United States: Protection, Promotion and Support*, , 161-178.
- Arslanoglu, S., Moro, G. E., Ziegler, E. E. & WAPM Working Group on Nutrition. (2010). Optimization of human milk fortification for preterm infants: New concepts and recommendations. *Journal of Perinatal Medicine*, 38(3), 233-238.
- Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., et al. (2013). Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), 535-542.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- Asensio, A., Oliver, A., Gonzalez-Diego, P., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., Ros, P., et al. (2000). Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: Antibiotic use as risk factor for colonization and infection. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 30(1), 55-60.
- Ashida, H., Ogawa, M., Kim, M., Mimuro, H. & Sasakawa, C. (2011). Bacteria and host interactions in the gut epithelial barrier. *Nature Chemical Biology*, 8(1), 36-45.
- Athamna, A., Ofek, I., Keisari, Y., Markowitz, S., Dutton, G. G. & Sharon, N. (1991). Lectinophagocytosis of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* mediated by surface lectins of guinea pig alveolar macrophages and human monocyte-derived macrophages. *Infection and Immunity*, 59(5), 1673-1682.
- Austin, M. & Leader, L. (2000). Maternal stress and obstetric and infant outcomes: Epidemiological findings and neuroendocrine mechanisms. *Australian and New Zealand Journal*

- of *Obstetrics and Gynaecology*, 40(3), 331-337.
- Bacchetta, J., Harambat, J., Dubourg, L., Guy, B., Liutkus, A., Canterino, I., et al. (2009). Both extrauterine and intrauterine growth restriction impair renal function in children born very preterm. *Kidney International*, 76(4), 445-452.
- Bach, S., de Almeida, A. & Carniel, E. (2000). The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiology Letters*, 183(2), 289-294.
- Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920.
- Badiee, P., Alborzi, A. & Joukar, M. (2011). Molecular assay to detect nosocomial fungal infections in intensive care units. *European Journal of Internal Medicine*, 22(6), 611-615.
- Bakken, J. S., Borody, T., Brandt, L. J., Brill, J. V., Demarco, D. C., Franzos, M. A., et al. (2011). Treating *Clostridium difficile* infection with fecal microbiota transplantation. *Clinical Gastroenterology and Hepatology : The Official Clinical Practice Journal of the American Gastroenterological Association*, 9(12), 1044-1049.
- Ballard, O. & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
- Balmer, S. E. & Wharton, B. A. (1989). Diet and faecal flora in the newborn: Breast milk and infant formula. *Archives of Disease in Childhood*, 64(12), 1672-1677.
- Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O'Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., et al. (2013). The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(4), F334-340.
- Barrington, K. J. (2011). Low blood pressure in extremely preterm infants: Does treatment affect outcome? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 96(5), F316-317.
- Barros, F. C., Bhutta, Z. A., Batra, M., Hansen, T. N., Victora, C. G. & Rubens, C. E. (2010). Global report on preterm birth and stillbirth (3 of 7): Evidence for effectiveness of interventions. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 10(Suppl 1), S3.
- Batton, B. J., Li, L., Newman, N. S., Das, A., Watterberg, K. L., Yoder, B. A., et al. (2012). Feasibility study of early blood pressure management in extremely preterm infants. *The Journal of Pediatrics*, 161(1), 65-69.
- Bearfield, C., Davenport, E. S., Sivapathasundaram, V. & Allaker, R. P. (2002). Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(5), 527-533.
- Beaussart, A., Herman, P., El-Kirat-Chatel, S., Lipke, P. N., Kucharikova, S., Van Dijck, P., et al. (2013). Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans* interaction. *Nanoscale*, 5(22), 10894-10900.
- Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A. P., Merialdi, M., Requejo, J. H., et al. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: A systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(1), 31-38.
- Begega, A., Méndez-López, M., De Iscar, M. J., Cuesta-Izquierdo, M., Solís, G., Fernández-Colomer, B., et al. (2010). Assessment of the global intelligence and selective cognitive capacities in preterm 8-year-old children. *Psicothema*, 22(4)
- Bennet, R., Eriksson, M. & Nord, C. (2002). The fecal microflora of 1-3-

- month-old infants during treatment with eight oral antibiotics. *Infection*, 30(3), 158-160.
- Benor, S., Marom, R., Tov, A. B., Domany, K. A., Zaidenberg-Israeli, G. & Dollberg, S. (2014). Probiotic supplementation in mothers of very low birth weight infants. *American Journal of Perinatology*, 31(6), 497-504.
- Berghella & Society for Maternal-Fetal Medicine Publications Committee. (2012). Progesterone and preterm birth prevention: Translating clinical trials data into clinical practice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(5), 376-386.
- Berrington, J. E., Stewart, C. J., Cummings, S. P. & Embleton, N. D. (2014). The neonatal bowel microbiome in health and infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 27(3), 236-243.
- Bhattacharya, S., Raja, E. A., Mirazo, E. R., Campbell, D. M., Lee, A. J., Norman, J. E., et al. (2010). Inherited predisposition to spontaneous preterm delivery. *Obstetrics and Gynecology*, 115(6), 1125-1133.
- Bhutta, Z., Dean, S., Imam, A. & Lassi, Z. (2011). A systematic review of preconception risks and interventions. *Karachi: The Aga Khan University*.
- Bisson, G., Fishman, N. O., Patel, J. B., Edelstein, P. H. & Lautenbach, E. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species: Risk factors for colonization and impact of antimicrobial formulary interventions on colonization prevalence. *Infection Control and Hospital Epidemiology : The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 23(5), 254-260.
- Blakey, J. L., Lubitz, L., Barnes, G. L., Bishop, R. F., Campbell, N. T. & Gillam, G. L. (1982). Development of gut colonisation in pre-term neonates. *Journal of Medical Microbiology*, 15(4), 519-529.
- Blanco-Quiros, A., Arranz, E., Solis, G., Villar, A., Ramos, A. & Coto, D. (2000). Cord blood interleukin-10 levels are increased in preterm newborns. *European Journal of Pediatrics*, 159(6), 420-423.
- Blencowe, H., Cousens, S., Chou, D., Oestergaard, M., Say, L., Moller, A., et al. (2012a). Chapter 2: 15 million preterm births: Priorities for action based on national, regional and global estimates. *Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth*. New York: March of Dimes, PMNCH, Save the Children, World Health Organization.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A., Narwal, R., et al. (2012b). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *The Lancet*, 379(9832), 2162-2172.
- Blencowe, H., Lawn, J. E., Vazquez, T., Fielder, A. & Gilbert, C. (2013). Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatric Research*, 74(S1), 35-49.
- Bloch, M., Althabe, F., Onyamboko, M., Kaseba-Sata, C., Castilla, E. E., Freire, S., et al. (2008). Tobacco use and secondhand smoke exposure during pregnancy: An investigative survey of women in 9 developing nations. *American Journal of Public Health*, 98(10), 1833-1840.
- Blondel, B., Macfarlane, A., Gissler, M., Breart, G. & Zeitlin, J. (2006). General obstetrics: Preterm birth and multiple pregnancy in european countries participating in the PERISTAT project. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 113(5), 528-535.
- Blondel, B. & Kaminski, M. (2002). Trends in the occurrence, determinants, and consequences of multiple births. *Seminars in Perinatology*, 26 (4), 239-249.
- Bloom, S. L., Yost, N. P., McIntire, D. D. & Leveno, K. J. (2001). Recurrence

- of preterm birth in singleton and twin pregnancies. *Obstetrics and Gynecology*, 98(3), 379-385.
- Bocca-Tjeertes, I. F., Kerstjens, J. M., Reijneveld, S. A., de Winter, A. F. & Bos, A. F. (2011). Growth and predictors of growth restraint in moderately preterm children aged 0 to 4 years. *Pediatrics*, 128(5), e1187-94.
- Bolton, C. E., Stocks, J., Hennessy, E., Cockcroft, J. R., Fawke, J., Lum, S., et al. (2012). The EPICure study: Association between hemodynamics and lung function at 11 years after extremely preterm birth. *The Journal of Pediatrics*, 161(4), 595-601.
- Borrueal, N. (2003). Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: Inmunomodulación. *Gastroenterología y Hepatología*, 26(1), 13-22.
- Boyd, C. A., Quigley, M. A. & Brocklehurst, P. (2007). Donor breast milk versus infant formula for preterm infants: Systematic review and meta-analysis. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 92(3), F169-75.
- Boye, K. & Hansen, D. S. (2003). Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: Taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(7), 495-503.
- Boyle, E. M., Poulsen, G., Field, D. J., Kurinczuk, J. J., Wolke, D., Alfirevic, Z., et al. (2012). Effects of gestational age at birth on health outcomes at 3 and 5 years of age: Population based cohort study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 344, e896.
- Bracewell, M. A., Hennessy, E. M., Wolke, D. & Marlow, N. (2008). The EPICure study: Growth and blood pressure at 6 years of age following extremely preterm birth. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 93(2), F108-14.
- Brandtzaeg, P. (2010). The mucosal immune system and its integration with the mammary glands. *The Journal of Pediatrics*, 156(Suppl 2), S8-15.
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., et al. (2009). Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One*, 4(3), e4982.
- Brisse, S., Issenhuth-Jeanjean, S. & Grimont, P. A. (2004). Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3388-3398.
- Brisse, S. & Verhoef, J. (2001). Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 915-924.
- Brisse, S., Grimont, F., and Grimont, P. E. (2006). The genus *Klebsiella*. In *The Prokaryotes* (pp. 159-196). Springer New York.
- Brock, J. H., Williams, P. H., Liceaga, J. & Wooldridge, K. G. (1991). Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infection and Immunity*, 59(9), 3185-3190.
- Bromberger, P. & Hallman, M. (1986). Myoinositol in small preterm infants: Relationship between intake and serum concentration. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 5(3), 455-458.
- Buddington, R. K., Williams, C. H., Kostek, B. M., Buddington, K. K. & Kullen, M. J. (2010). Maternal-to-infant transmission of probiotics:

- Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97(3), 250-256.
- Bustos, G. (2008). Alimentación enteral del recién nacido pretérmino. *Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos De La AEP: Neonatología. Asociación Española De Pediatría Y Sociedad Española De Neonatología. Madrid: AEP*, 58-67.
- Butel, M. J., Suau, A., Campeotto, F., Magne, F., Aires, J., Ferraris, L., et al. (2007). Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: A prospective analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 44(5), 577-582.
- Campeotto, F., Suau, A., Kapel, N., Magne, F., Viallon, V., Ferraris, L., et al. (2011). A fermented formula in pre-term infants: Clinical tolerance, gut microbiota, down-regulation of faecal calprotectin and up-regulation of faecal secretory IgA. *British Journal of Nutrition*, 105(12), 1843-1851.
- Canton, R. & Coque, T. M. (2006). The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466-475.
- Cario, E. (2005). Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. *Gut*, 54(8), 1182-1193.
- Carlisle, E. M. & Morowitz, M. J. (2013). The intestinal microbiome and necrotizing enterocolitis. *Current Opinion in Pediatrics*, 25(3), 382-387.
- Carmody, J. B. & Charlton, J. R. (2013). Short-term gestation, long-term risk: Prematurity and chronic kidney disease. *Pediatrics*, 131(6), 1168-1179.
- Castellote, C., Casillas, R., Ramirez-Santana, C., Perez-Cano, F. J., Castell, M., Moretones, M. G., et al. (2011). Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *The Journal of Nutrition*, 141(6), 1181-1187.
- Cattaneo, A., Davanzo, R., Uxa, F. & Tamburlini, G. (1998). Recommendations for the implementation of kangaroo mother care for low birthweight infants. *Acta Paediatrica*, 87(4), 440-445.
- CDC. (2010). *Pretrem birth*. Retrieved Agosto, 2014, from <http://www.cdc.gov/reproductivehealth/maternalinfanthealth/pretermbirth.htm>
- Challis, J. R. & Smith, S. K. (2001). Fetal endocrine signals and preterm labor. *Biology of the Neonate*, 79(3-4), 163-167.
- Chang, H. H., Larson, J., Blencowe, H., Spong, C. Y., Howson, C. P., Cairns-Smith, S., et al. (2013). Preventing preterm births: Analysis of trends and potential reductions with interventions in 39 countries with very high human development index. *The Lancet*, 381(9862), 223-234.
- Chang, J. Y., Shin, S. M., Chun, J., Lee, J. H. & Seo, J. K. (2011). Pyrosequencing-based molecular monitoring of the intestinal bacterial colonization in preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 512-519.
- Chauhan, M., Henderson, G. & McGuire, W. (2008). Enteral feeding for very low birth weight infants: Reducing the risk of necrotising enterocolitis. *Archives of Disease in Childhood.Fetal and Neonatal Edition*, 93(2), F162-6.
- Chavan, M., Rafi, H., Wertz, J., Goldstone, C. & Riley, M. A. (2005). Phage associated bacteriocins reveal a novel mechanism for bacteriocin diversification in *Klebsiella*. *Journal of Molecular Evolution*, 60(4), 546-556.
- Chaves, J., Ladona, M. G., Segura, C., Coira, A., Reig, R. & Ampurdanes, C. (2001). SHV-1 beta-lactamase is mainly a chromosomally encoded species-specific enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), 2856-2861.

- Chen, A. C., Chung, M. Y., Chang, J. H. & Lin, H. C. (2014). Pathogenesis implication for necrotizing enterocolitis prevention in preterm very-low-birth-weight infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58(1), 7-11.
- Christianson, A., Howson, C. & Modell, B. (2006). March of dimes global report on birth defects: The hidden toll of dying and disabled children. *New York: March of Dimes Birth Defects Foundation*. Viewed 19 June 2008.
- Chuang, Y. P., Fang, C. T., Lai, S. Y., Chang, S. C. & Wang, J. T. (2006). Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. *The Journal of Infectious Diseases*, 193(5), 645-654.
- Cilieborg, M. S., Boye, M. & Sangild, P. T. (2012). Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Human Development*, 88, S41-S49.
- Claud, E. C. & Walker, W. A. (2001). Hypothesis: Inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(8), 1398-1403.
- Cnattingius, S. (2004). The epidemiology of smoking during pregnancy: Smoking prevalence, maternal characteristics, and pregnancy outcomes. *Nicotine & Tobacco Research: Official Journal of the Society for Research on Nicotine and Tobacco*, 6 (Suppl 2), S125-140.
- Coker, A. L., Sanderson, M. & Dong, B. (2004). Partner violence during pregnancy and risk of adverse pregnancy outcomes. *Paediatric and Perinatal Epidemiology*, 18(4), 260-269.
- Collins, S. M., Surette, M. & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735-742.
- Comunidad de Madrid. (2004). Brotes epidémicos, año 2003. *Boletín Epidemiológico De La CAM*, 10(3), 63.
- Comunidad de Madrid. (2005). Brote comunitario de rubéola en la población residente en la CAM, año 2005. *Boletín Epidemiológico De La CM*, 11, 11.
- Conde-Agudelo, A., Rosas-Bermudez, A. & Kafury-Goeta, A. C. (2006). Birth spacing and risk of adverse perinatal outcomes: A meta-analysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 295(15), 1809-1823.
- Consejería de Sanidad de la Comunidad de Madrid. (2013). Plan de eliminación del sarampión, rubéola y síndrome de rubéola congénita en la comunidad de madrid. *Consejería De Sanidad. Dirección General De Atención Primaria., Documentos Técnicos de Salud Pública nº D134*.
- Costeloe, K., Hennessy, E., Gibson, A. T., Marlow, N. & Wilkinson, A. R. (2000). The EPICure study: Outcomes to discharge from hospital for infants born at the threshold of viability. *Pediatrics*, 106(4), 659-671.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Cronin, C. M., Shapiro, C. R., Casiro, O. G. & Cheang, M. S. (1995). The impact of very low-birth-weight infants on the family is long lasting. A matched control study. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 149(2), 151-158.
- D'Agata, E., Venkataraman, L., DeGirolami, P., Weigel, L., Samore, M. & Tenover, F. (1998). The molecular and clinical epidemiology of *Enterobacteriaceae*-producing extended-spectrum beta-lactamase in a tertiary care hospital. *The Journal of Infection*, 36(3), 279-285.
- Dasanayake, A. P., Li, Y., Wiener, H., Ruby, J. D. & Lee, M. J. (2005).

- Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of Periodontology*, 76(2), 171-177.
- Davis, L., Edwards, H., Mohay, H. & Wollin, J. (2003). The impact of very premature birth on the psychological health of mothers. *Early Human Development*, 73(1), 61-70.
- De Champs, C., Rouby, D., Guelon, D., Sirot, J., Sirot, D., Beytout, D., et al. (1991). A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) beta-lactamase. *The Journal of Hospital Infection*, 18(1), 5-13.
- De Champs, C., Sauvant, M. P., Chanal, C., Sirot, D., Gazuy, N., Malhuret, R., et al. (1989). Prospective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(12), 2887-2890.
- de Jong, M., Verhoeven, M. & van Baar, A. L. (2012). School outcome, cognitive functioning, and behaviour problems in moderate and late preterm children and adults: A review. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, 17(3), 163-169.
- de Lorenzo, V. & Martinez, J. L. (1988). Aerobactin production as a virulence factor: A reevaluation. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 7(5), 621-629.
- De Man, P., Verhoeven, B., Verbrugh, H., Vos, M. & Van Den Anker, J. (2000). An antibiotic policy to prevent emergence of resistant bacilli. *The Lancet*, 355(9208), 973-978.
- de Vos, W. M. (2013). Fame and future of faecal transplantations-developing next-generation therapies with synthetic microbiomes. *Microbial Biotechnology*, 6(4), 316-325.
- de Weerth, C., Fuentes, S. & de Vos, W. M. (2013). Crying in infants: On the possible role of intestinal microbiota in the development of colic. *Gut Microbes*, 4(5), 416-421.
- Dean, S. V., Mason, E. M., Howson, C. P., Lassi, Z. S., Imam, A. M. & Bhutta, Z. A. (2013). Born too soon: Care before and between pregnancy to prevent preterm births: From evidence to action. *Reproductive Health*, 10(Suppl 1), S3.
- Di Mauro, A., Neu, J., Riezzo, G., Raimondi, F., Martinelli, D., Francavilla, R., et al. (2013). Gastrointestinal function development and microbiota. *Italian Journal of Pediatrics*, 39(15), 1-7.
- Di Natale, C., Coclite, E., Di Ventura, L. & Di Fabio, S. (2011). Fortification of maternal milk for preterm infants. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 24(S1), 41-43.
- Dial, M. S. (2009). Proton pump inhibitor use and enteric infections. *The American Journal of Gastroenterology*, 104 Suppl 2, S10-6.
- DiBiasie, A. (2006). Evidence-based review of retinopathy of prematurity prevention in VLBW and ELBW infants. *Neonatal Network: The Journal of Neonatal Nursing*, 25(6), 393-403.
- DiGiulio, D. B., Romero, R., Amogan, H. P., Kusanovic, J. P., Bik, E. M., Gotsch, F., et al. (2008). Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: A molecular and culture-based investigation. *PLoS One*, 3(8), e3056.
- Donovan, S. M. (2006). Role of human milk components in gastrointestinal development: Current knowledge and future. *The Journal of Pediatrics*, 149(5) S49-S61.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov.

- and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925-932.
- Drasar, B. S. & Barrow, P. (1985). *Intestinal microbiology*, nº 10.
- Drevinek, P., Vosahlikova, S., Cinek, O., Vavrova, V., Bartosova, J., Pohunek, P., et al. (2005). Widespread clone of *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. *Journal of Medical Microbiology*, 54(7), 655-659.
- Du, B., Long, Y., Liu, H., Chen, D., Liu, D., Xu, Y., et al. (2002). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: Risk factors and clinical outcome. *Intensive Care Medicine*, 28(12), 1718-1723.
- Dunkel-Schetter, C. (1998). Maternal stress and preterm delivery. *Prenatal and Neonatal Medicine*, 3, 39-42.
- Dutka-Malen, S., Evers, S. & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 24-27.
- Dvorak, B., Fituch, C. C., Williams, C. S., Hurst, N. M. & Schanler, R. J. (2003). Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatric Research*, 54(1), 15-19.
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., et al. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635-1638.
- Edmond, K. & Bahl, R. (2008). Optimal feeding of low-birth-weight infants. *Geneva, Switzerland: World Health Organization*, 2006.
- EFCNI. (2011). *European Foundation for the Care of Newborn Infants*. Retrieved Septiembre, 2014, from <http://www.efcni.org/>
- Ehrenkranz, R. A. (2010). Early nutritional support and outcomes in ELBW infants. *Early Human Development*, 86 (Suppl 1), 21-25.
- Eichenwald, E. C. & Stark, A. R. (2008). Management and outcomes of very low birth weight. *The New England Journal of Medicine*, 358(16), 1700-1711.
- Eidelman, A. I. (2012). Breastfeeding and the use of human milk: An analysis of the American Academy of Pediatrics, breastfeeding policy statement. *Breastfeeding Medicine*, 7(5), 323-324.
- Eisengart, S. P., Singer, L. T., Fulton, S. & Baley, J. E. (2003). Coping and psychological distress in mothers of very low birth weight young children. *Parenting: Science and Practice*, 3(1), 49-72.
- El Aidy, S., Hooiveld, G., Tremaroli, V., Backhed, F. & Kleerebezem, M. (2013). The gut microbiota and mucosal homeostasis: Colonized at birth or at adulthood, does it matter? *Gut Microbes*, 4(2), 118-124.
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S. & Bakour, R. (2013). Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. *Pathologie-Biologie*, 61(5), 209-216.
- Elgen, S. K., Leversen, K. T., Grundt, J. H., Hurum, J., Sundby, A. B., Elgen, I. B., et al. (2012). Mental health at 5 years among children born extremely preterm: A national population-based study. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 21(10), 583-589.
- Elsinga, J., de Jong-Potjer, L. C., van der Pal-de Bruin, Karin M, le Cessie, S., Assendelft, W. J. & Buitendijk, S. E. (2008). The effect of preconception counselling on lifestyle and other behaviour before and during pregnancy. *Women's Health Issues*, 18(6), S117-S125.
- Embleton, N. E., Pang, N. & Cooke, R. J. (2001). Postnatal malnutrition and growth retardation: An inevitable consequence of current

- recommendations in preterm infants? *Pediatrics*, 107(2), 270-273.
- Escobar, G. J., Clark, R. H. & Greene, J. D. (2006). Short-term outcomes of infants born at 35 and 36 weeks gestation: We need to ask more questions. *Seminars in Perinatology*, 30(1), 28-33.
- Escuder-Vieco, D., Garcia-Algar, Ó, Pichini, S., Pacifici, R., García-Lara, N. R. & Pallás-Alonso, C. R. (2013). Validation of a screening questionnaire for a human milk bank to determine the presence of illegal drugs, nicotine, and caffeine. *The Journal of Pediatrics*,
- Espinosa-Martos, I., Moles, L., Manzano, S., Fernández, L., Montilla, A., Corzo, N., et al. (2014). Bacteriological, biochemical and immunological properties of colostrum and milk from mothers of extremely preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, in press.
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., de Segura, A. G., Escuder, D., Bustos, G., Pallas, C., et al. (2013). Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 560-568.
- Esplin, M. S., O'Brien, E., Fraser, A., Kerber, R. A., Clark, E., Simonsen, S. E., et al. (2008). Estimating recurrence of spontaneous preterm delivery. *Obstetrics and Gynecology*, 112(3), 516-523.
- European Centre for Disease and Control. (2012). *Measles and rubella monitoring*. Retrieved 4/12, 2014, from <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/measles-rubella-monthly-surveillance-dec-2012.pdf>
- Eveillard, M., Schmit, J. L. & Eb, F. (2002). Antimicrobial use prior to the acquisition of multiresistant bacteria. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 23(3), 155-158.
- Ewer, A. & Yu, V. (1996). Gastric emptying in preterm infants: The effect of breast milk fortifier. *Acta Paediatrica*, 85(9), 1112-1115.
- Fanaro, S. (2010). Which is the ideal target for preterm growth? *Minerva Pediatrica*, 62(3 Suppl 1), 77-82.
- Fanaro, S., Chierici, R., Guerrini, P. & Vigi, V. (2003). Intestinal microflora in early infancy: Composition and development. *Acta Paediatrica*, 91(441), 48-55.
- Fanaroff, A. A., Stoll, B. J., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Stark, A. R., et al. (2007). Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 196(2), 147.e1-147.e8.
- Fang, C. T., Chuang, Y. P., Shun, C. T., Chang, S. C. & Wang, J. T. (2004). A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *The Journal of Experimental Medicine*, 199(5), 697-705.
- Farrell, P. M. & Wood, R. E. (1976). Epidemiology of hyaline membrane disease in the United States: Analysis of national mortality statistics. *Pediatrics*, 58(2), 167-176.
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. & Akkermans, A. D. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 219-226.
- Favre, A., Szylił, O., Popot, F., Catala, I., Rondeau, C., Muraige, C., et al. (2002). Diet, length of gestation, and fecal short chain fatty acids in healthy premature neonates. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 26(1), 51-56.
- Fawke, J., Lum, S., Kirkby, J., Hennessy, E., Marlow, N., Rowell, V., et al. (2010). Lung function and respiratory symptoms at 11 years in children born extremely preterm: The EPICure study. *American Journal of*

- Respiratory and Critical Care Medicine*, 182(2), 237-245.
- Felberbaum, R. E. (2007). Multiple pregnancies after assisted reproduction-international comparison. *Reproductive Biomedicine Online*, 15(Suppl 3), 53-60.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., et al. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 1-10.
- Ferraris, L., Butel, M. J., Campeotto, F., Vodovar, M., Roze, J. C. & Aires, J. (2012). Clostridia in premature neonates' gut: Incidence, antibiotic susceptibility and perinatal determinants influencing colonization. *PLoS One*, 7(1), e30594.
- Fichorova, R. N., Onderdonk, A. B., Yamamoto, H., Delaney, M. L., DuBois, A. M., Allred, E., et al. (2011). Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *mBio*, 2(1), e00280-10.
- Fidler, N., Sauerwald, T. U., Koletzko, B. & Demmelmair, H. (1998). Effects of human milk pasteurization and sterilization on available fat content and fatty acid composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 27(3), 317-322.
- Fierer, J., Walls, L. & Chu, P. (2011). Recurring *Klebsiella pneumoniae* pyogenic liver abscesses in a resident of san diego, california, due to a K1 strain carrying the virulence plasmid. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(12), 4371-4373.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P. & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3(4), 289-306.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., et al. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*, 432(7019), 917-921.
- Fouhy, F., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. & Cotter, P. D. (2012). Composition of the early intestinal microbiota: Knowledge, knowledge gaps and the use of high-throughput sequencing to address these gaps. *Gut Microbes*, 3(3), 203-220.
- Fournier, B., Roy, P. H., Lagrange, P. H. & Philippon, A. (1996). Chromosomal beta-lactamase genes of *Klebsiella oxytoca* are divided into two main groups, blaOXY-1 and blaOXY-2. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 454-459.
- Funkhouser, L. J. & Bordenstein, S. R. (2013). Mom knows best: The universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biology*, 11(8), e1001631.
- Ganert, M., Been, J., Gavilanes, A., Garnier, Y., Zimmermann, L. & Kramer, B. (2010). Chorioamnionitis: A multiorgan disease of the fetus&quest. *Journal of Perinatology*, 30, S21-S30.
- García-Lara, N., García-Algar, O. & Alonso, C. R. P. (2012). Sobre bancos de leche humana y lactancia materna. *Anales De Pediatría: Publicación Oficial De La Asociación Española De Pediatría (AEP)*, 76(5), 247-249.
- Garland, S. M., Tobin, J. M., Pirota, M., Tabrizi, S. N., Opie, G., Donath, S., et al. (2011). The ProPremis trial: Investigating the effects of probiotics on late onset sepsis in very preterm infants. *BMC Infectious Diseases*, 11, 210-2334-11-210.
- Garofalo, R. (2010). Cytokines in human milk. *The Journal of Pediatrics*, 156(Suppl 2), S36-40.
- Gavard, J. A. & Artal, R. (2008). Effect of exercise on pregnancy outcome. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 51(2), 467-480.
- Gerlach, G. F., Clegg, S. & Allen, B. L. (1989). Identification and characterization of the genes

- encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1262-1270.
- Gershon, M. D. (1998). V. Genes, lineages, and tissue interactions in the development of the enteric nervous system. *The American Journal of Physiology*, 275(5), G869-873.
- Gewolb, I. H., Schwalbe, R. S., Taciak, V. L., Harrison, T. S. & Panigrahi, P. (1999). Stool microflora in extremely low birthweight infants. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 80(3), F167-73.
- Gianni, M. L., Roggero, P., Piemontese, P., Orsi, A., Amato, O., Taroni, F., et al. (2012). Body composition in newborn infants: 5-year experience in an italian neonatal intensive care unit. *Early Human Development*, 88 (Suppl 1), S13-7.
- Goehler, L. E., Gaykema, R. P., Nguyen, K. T., Lee, J. E., Tilders, F. J., Maier, S. F., et al. (1999). Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: A link between the immune and nervous systems? *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 19(7), 2799-2806.
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D. & Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *The Lancet*, 371(9606), 75-84.
- Goldenberg, R. L., Gravett, M. G., Iams, J., Papageorgiou, A. T., Waller, S. A., Kramer, M., et al. (2012). The preterm birth syndrome: Issues to consider in creating a classification system. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(2), 113-118.
- Gómez de Segura, A., Escuder, D., Montilla, A., Bustos, G., Pallas, C., Fernandez, L., et al. (2012). Heating-induced bacteriological and biochemical modifications in human donor milk after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 54(2), 197-203.
- Gomez, C., Broseta, A., Otero, J. R. & Chaves, F. (2007). Primary pyogenic liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Clinical Microbiology Newsletter*, 29(13), 100-102.
- Goodacre, R. (2007). Metabolomics of a superorganism. *The Journal of Nutrition*, 137(Suppl 1), 259S-266S.
- Gosalbes, M. J., Llop, S., Valles, Y., Moya, A., Ballester, F. & Francino, M. P. (2013). Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 43(2), 198-211.
- Gough, E., Shaikh, H. & Manges, A. R. (2011). Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 53(10), 994-1002.
- Goya, M., Pratcorona, L., Merced, C., Rodó, C., Valle, L., Romero, A., et al. (2012). Cervical pessary in pregnant women with a short cervix (PECEP): An open-label randomised controlled trial. *The Lancet*, 379(9828), 1800-1806.
- Gravett, M. G., Rubens, C. E. & Nunes, T. M. (2010). Global report on preterm birth and stillbirth (2 of 7): Discovery science. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 10(Suppl 1), S2.
- Guarner, F. & Malagelada, J. R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361(9356), 512-519.
- Gueimonde, M., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. (2007). Breast milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology*, 92(1), 64-66.
- Gupta, A. (2002). Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit: *Klebsiella pneumoniae*.

- Seminars in Perinatology*, 26(5), 340-345.
- Gupta, A., Ampofo, K., Rubenstein, D. & Saiman, L. (2003). Extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: A review of the literature. *Journal of Perinatology : Official Journal of the California Perinatal Association*, 23(6), 439-443.
- Gyamfi-Bannerman, C., Fuchs, K. M., Young, O. M. & Hoffman, M. K. (2011). Non spontaneous late preterm birth: Etiology and outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 205(5), 456.e1-456.e6.
- Hack, M., Schluchter, M., Andreias, L., Margevicius, S., Taylor, H. G., Drotar, D., et al. (2011). Change in prevalence of chronic conditions between childhood and adolescence among extremely low-birth-weight children. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 306(4), 394-401.
- Hall, R. T. (2001). Nutritional follow-up of the breastfeeding premature infant after hospital discharge. *Pediatric Clinics of North America*, 48(2), 453-460.
- Hallman, M., Bry, K., Hoppu, K., Lappi, M. & Pohjavuori, M. (1992). Inositol supplementation in premature infants with respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, 326(19), 1233-1239.
- Hamosh, M. (1994). Breast milk storage: review of the literature and recommendations for research needs. *San Diego: Welestart International*.
- Hamosh, M. (2001). Bioactive factors in human milk. *Pediatric Clinics of North America*, 48(1), 69-86.
- Han, Z., Mulla, S., Beyene, J., Liao, G., McDonald, S. D. & Knowledge Synthesis Group. (2011). Maternal underweight and the risk of preterm birth and low birth weight: A systematic review and meta-analyses. *International Journal of Epidemiology*, 40(1), 65-101.
- Hansen, D. S., Aucken, H. M., Abiola, T. & Podschun, R. (2004). Recommended test panel for differentiation of *Klebsiella* species on the basis of a trilateral interlaboratory evaluation of 18 biochemical tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3665-3669.
- Hansen, D. S., Gottschau, A. & Kolmos, H. J. (1998). Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: A case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *The Journal of Hospital Infection*, 38(2), 119-132.
- Hao, W. & Lee, Y. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract. *Public health microbiology* (pp. 491-502) Springer.
- Harmsen, H. J., Wildeboer-Veloo, A. C., Raangs, G. C., Wagendorp, A. A., Klijn, N., Bindels, J. G., et al. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30(1), 61-67.
- Hart, S., Boylan, L. M., Carroll, S., Musick, Y. A. & Lampe, R. M. (2003). Brief report: Breast-fed one-week-olds demonstrate superior neurobehavioral organization. *Journal of Pediatric Psychology*, 28(8), 529-534.
- Hegarty, K., Gunn, J., Chondros, P. & Small, R. (2004). Association between depression and abuse by partners of women attending general practice: Descriptive, cross sectional survey. *British Medical Journal*, 328(7440), 621-624.
- Heikkilä, M. P. & Saris, P. E. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 471-478.
- Helfand, M. S. & Bonomo, R. A. (2003). Beta-lactamases: A survey of protein diversity. *Current Drug Targets. Infectious Disorders*, 3(1), 9-23.
- Hell, E., Giske, C. G., Hultenby, K., Danielsson, K. G. & Marchini, G. (2013). Attachment and biofilm

- forming capabilities of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from preterm infants. *Current Microbiology*, 67(6), 712-717.
- Henderson, A. (2005). Vitamin D and the breastfed infant. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 34(3), 367-372.
- Ho, P. L., Chan, W. M., Tsang, K. W., Wong, S. S. & Young, K. (2002). Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: A case-control study of risk factors and outcomes. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 34(8), 567-573.
- Holbrook, A. M. & Kaltenbach, K. A. (2011). Effectiveness of a smoking cessation intervention for methadone-maintained women: A comparison of pregnant and parenting women. *International Journal of Pediatrics*, 2011, ID:567056.
- Honein, M. A., Kirby, R. S., Meyer, R. E., Xing, J., Skerrette, N. I., Yuskiv, N., et al. (2009). The association between major birth defects and preterm birth. *Maternal and Child Health Journal*, 13(2), 164-175.
- Honein, M. A., Rasmussen, S. A., Reefhuis, J., Romitti, P. A., Lammer, E. J., Sun, L., et al. (2007). Maternal smoking and environmental tobacco smoke exposure and the risk of orofacial clefts. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 18(2), 226-233.
- Hooper, L. V. & Macpherson, A. J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 159-169.
- Hooper, L. V., Midtvedt, T. & Gordon, J. I. (2002). How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 283-307.
- Hooper, L. V. & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Howlett, A., Ohlsson, A. & Plakkal, N. (2012). Inositol for respiratory distress syndrome in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 3.
- Howson, C., Kinney, M. & Lawn, J. (2012). Born too soon: The global action report on preterm birth. *Geneva: World Health Organization*.
- Hsu, C. R., Lin, T. L., Chen, Y. C., Chou, H. C. & Wang, J. T. (2011). The role of *Klebsiella pneumoniae rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology*, 157(12), 3446-3457.
- Hu, J., Nomura, Y., Bashir, A., Fernandez-Hernandez, H., Itzkowitz, S., Pei, Z., et al. (2013). Diversified microbiota of meconium is affected by maternal diabetes status. *PloS One*, 8(11), e78257.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schutte, U. M., Beck, D. L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One*, 6(6), e21313.
- Hunt, K. M., Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C. A., Williams, J. E., Shafii, B., et al. (2012). Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4763-4770.
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Hilton, A., Armstrong, R., et al. (2009). Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the *Enterobacteriaceae*. *BMC Infectious Diseases*, 9, 146-2334-9-146.
- Iams, J. D., Romero, R., Culhane, J. F. & Goldenberg, R. L. (2008). Primary, secondary, and tertiary interventions to reduce the morbidity and mortality of preterm birth. *The Lancet*, 371(9607), 164-175.
- Ibrahim, C. P. & Yoxall, C. W. (2010). Use of self-heating gel mattresses

- eliminates admission hypothermia in infants born below 28 weeks gestation. *European Journal of Pediatrics*, 169(7), 795-799.
- Institute of Medicine (US) Committee on Understanding Premature Birth and Assuring Healthy Outcomes. (2007).
- Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. & Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(Suppl 2), 444S-450S.
- Izquierdo, L., Coderch, N., Pique, N., Bedini, E., Corsaro, M. M., Merino, S., et al. (2003). The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: Role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *Journal of Bacteriology*, 185(24), 7213-7221.
- Jacobs, S. E., Tobin, J. M., Opie, G. F., Donath, S., Tabrizi, S. N., Pirotta, M., et al. (2013). Probiotic effects on late-onset sepsis in very preterm infants: A randomized controlled trial. *Pediatrics*, 132(6), 1055-1062.
- Jacoby, G. A. (1994). Genetics of extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 13 (Suppl 1), S2-11.
- Jacoby, G. A. & Muñoz-Price, L. S. (2005). The new beta-lactamases. *The New England Journal of Medicine*, 352(4), 380-391.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., et al. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *The Journal of Pediatrics*, 158(3), 390-396.
- Jain, T., Missmer, S. A. & Hornstein, M. D. (2004). Trends in embryo-transfer practice and in outcomes of the use of assisted reproductive technology in the united states. *New England Journal of Medicine*, 350(16), 1639-1645.
- Jalanka-Tuovinen, J., Salonen, A., Nikkila, J., Immonen, O., Kekkonen, R., Lahti, L., et al. (2011). Intestinal microbiota in healthy adults: Temporal analysis reveals individual and common core and relation to intestinal symptoms. *PloS One*, 6(7), e23035.
- Janvier, A., Malo, J. & Barrington, K. J. (2014). Cohort study of probiotics in a north american neonatal intensive care unit. *The Journal of Pediatrics* 164(5), 980-985.
- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G. & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.
- Jeurink, P. V., van Esch, B. C., Rijniere, A., Garssen, J. & Knippels, L. M. (2013). Mechanisms underlying immune effects of dietary oligosaccharides. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 98(2), 572S-7S.
- Jiao, Y., Zhang, W., Ma, J., Wen, C., Wang, P., Wang, Y., et al. (2011). Early onset of neonatal listeriosis. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 53(6), 1034-1037.
- Jimenez, E., Delgado, S., Fernandez, L., Garcia, N., Albuja, M., Gomez, A., et al. (2008a). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*, 159(9-10), 595-601.
- Jimenez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albuja, M., Garcia, N., et al. (2008b). *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*, 8, 143.
- Jimenez, E., Fernandez, L., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Nueno-Palop, C., et al. (2005). Isolation of

- commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51(4), 270-274.
- Jimenez, E., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Olivares, M., Xaus, J., et al. (2008c). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159(3), 187-193.
- Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Menard, M., Gajewski, A., Xercavins, M. & Garau, J. (2006). Similarity between human and chicken *Escherichia coli* isolates in relation to ciprofloxacin resistance status. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(1), 71-78.
- Johnson, S., Hollis, C., Kochhar, P., Hennessy, E., Wolke, D. & Marlow, N. (2010). Autism spectrum disorders in extremely preterm children. *The Journal of Pediatrics*, 156(4), 525-31.
- Johnson, S. & Marlow, N. (2011). Preterm birth and childhood psychiatric disorders. *Pediatric Research*, 69(5), 11R-8R.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253-1262.
- Jóźwik, M., Jóźwik, M., Teng, C., Jóźwik, M. & Battaglia, F. C. (2013). Human breast milk sugars and polyols over the first 10 puerperium days. *American Journal of Human Biology*, 25(2), 198-204.
- Kalra, S. K. & Molinaro, T. A. (2008). The association of *in vitro* fertilization and perinatal morbidity. *Seminars in Reproductive Medicine*, 26. (05) pp. 423-435.
- Kaprio, J. & Marttila, R. (2005). Demographic trends in nordic countries. *Multiple Pregnancy: Epidemiology, Gestation & Perinatal Outcome*, 22-25.
- Kaufmann, M. E. (1998). Pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular bacteriology* (pp. 33-50) Springer.
- Keijzer-Veen, M. G., Devos, A. S., Meradji, M., Dekker, F. W., Nauta, J. & van der Heijden, B. J. (2010). Reduced renal length and volume 20 years after very preterm birth. *Pediatric Nephrology*, 25(3), 499-507.
- Kent, A. L., Wright, I. M., Abdel-Latif, M. E. & New South Wales and Australian Capital Territory Neonatal Intensive Care Units Audit Group. (2012). Mortality and adverse neurologic outcomes are greater in preterm male infants. *Pediatrics*, 129(1), 124-131.
- Kerkhof, G. F., Breukhoven, P. E., Leunissen, R. W., Willemsen, R. H. & Hokken-Koelega, A. C. (2012). Does preterm birth influence cardiovascular risk in early adulthood? *The Journal of Pediatrics*, 161(3), 390-396.e1.
- Kim, B. N., Woo, J. H., Kim, M. N., Ryu, J. & Kim, Y. S. (2002a). Clinical implications of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *The Journal of Hospital Infection*, 52(2), 99-106.
- Kim, Y. K., Pai, H., Lee, H. J., Park, S. E., Choi, E. H., Kim, J., et al. (2002b). Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1481-1491.
- Klemm, P. & Schembri, M. A. (2000). Bacterial adhesins: Function and structure. *International Journal of Medical Microbiology*, 290(1), 27-35.
- Klingenberg, C., Embleton, N. D., Jacobs, S. E., O'Connell, L. A. & Kuschel, C. A. (2012). Enteral feeding practices in very preterm infants: An international survey. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 97(1), F56-61.
- Koczura, R. & Kaznowski, A. (2003). Occurrence of the *Yersinia* high-pathogenicity island and iron uptake systems in clinical isolates of

- Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 35(5), 197-202.
- Koenig, A., de Albuquerque Diniz, E. M., Barbosa, S. F. & Vaz, F. A. (2005). Immunologic factors in human milk: The effects of gestational age and pasteurization. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 21(4), 439-443.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (Suppl 1), 4578-4585.
- Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980). The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of Periodontal Research*, 15(2), 111-122.
- Kotecha, S. J., Watkins, W. J., Paranjothy, S., Dunstan, F. D., Henderson, A. J. & Kotecha, S. (2012). Effect of late preterm birth on longitudinal lung spirometry in school age children and adolescents. *Thorax*, 67(1), 54-61.
- Kristóf, K., Szabó, D., Marsh, J., Cser, V., Janik, L., Rozgonyi, F., et al. (2007). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: Risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(8), 563-570.
- Kullen, M., Sanozky-Dawes, R., Crowell, D. & Klaenhammer, T. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 511-516.
- Langhendries, J. P. (2006). Early bacterial colonisation of the intestine: Why it matters? [Colonisation bacterienne de l'intestin dans l'enfance: pourquoi y accorder autant d'importance?] *Archives De Pédiatrie : Organe Officiel De La Société Française De Pédiatrie*, 13(12), 1526-1534.
- Lapillonne, A., O'Connor, D. L., Wang, D. & Rigo, J. (2013). Nutritional recommendations for the late-preterm infant and the preterm infant after hospital discharge. *The Journal of Pediatrics*, 162(3), S90-S100.
- LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., et al. (2011). Beyond bacteria: A study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One*, 6(12), e27858.
- Lautenbach, E., Patel, J. B., Bilker, W. B., Edelstein, P. H. & Fishman, N. O. (2001). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(8), 1162-1171.
- Lavender, H. F., Jagnow, J. R. & Clegg, S. (2004). Biofilm formation *in vitro* and virulence *in vivo* of mutants of *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 72(8), 4888-4890.
- Lawlor, M. S., O'Connor, C. & Miller, V. L. (2007). Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and Immunity*, 75(3), 1463-1472.
- Lawn, J. E., Gravett, M. G., Nunes, T. M., Rubens, C. E., Stanton, C. & GAPPS Review Group. (2010). Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): Definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy and Childbirth*, 10 (Suppl 1), S1-2393-10-S1-S1.
- Leclerc, H., Mossel, D., Edberg, S. & Struijk, C. (2001). Advances in the bacteriology of the coliform group: Their suitability as markers of microbial water safety. *Annual*

- Reviews in Microbiology*, 55(1), 201-234.
- Lee da, E., Park, S. Y., Choi, J. S., Kim, S. Y., Lim, J. H., Yang, J. H., et al. (2012). Early second trimester maternal plasma levels of thrombin-inhibitor complexes and subsequent spontaneous preterm delivery. *Prenatal Diagnosis*, 32(12), 1170-1173.
- Lee, S. E., Romero, R., Park, C. W., Jun, J. K. & Yoon, B. H. (2008). The frequency and significance of intraamniotic inflammation in patients with cervical insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(6), 633.e1-633.e8.
- Lemozy, J., Sirot, D., Chanal, C., Huc, C., Labia, R., Dabernat, H., et al. (1995). First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(11), 2580-2582.
- Lennox-King, S., O'Farrell, S., Bettelheim, K. & Shooter, R. (1976a). Colonization of caesarean section babies by *Escherichia coli*. *Infection*, 4(3), 134-138.
- Lennox-King, S., O'Farrell, S., Bettelheim, K. & Shooter, R. (1976b). *Escherichia coli* isolated from babies delivered by caesarean section and their environment. *Infection*, 4(3), 139-145.
- Leser, T. D. & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: The benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental Microbiology*, 11(9), 2194-2206.
- Lim, J. W. (2011). The changing trends in live birth statistics in Korea, 1970 to 2010. *Korean Journal of Pediatrics*, 54(11), 429-435.
- Little, M. L., Qin, X., Zerr, D. M. & Weissman, S. J. (2014). Molecular epidemiology of colonizing and disease-causing *Klebsiella pneumoniae* in paediatric patients. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 4), 610-616.
- Liu, L., Johnson, H. L., Cousens, S., Perin, J., Scott, S., Lawn, J. E., et al. (2012). Global, regional, and national causes of child mortality: An updated systematic analysis for 2010 with time trends since 2000. *Lancet*, 379(9832), 2151-2161.
- Logan, L. K., Healy, S. A., Kabat, W. J., Liu, G., Sullivan, C. L., Peaceman, A. M., et al. (2013). A prospective cohort pilot study of the clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pregnant women at the time of group B streptococcal screening in a large urban medical center in Chicago, IL, USA. *Virulence*, 4(7), 654-658.
- Lucas, A. & Cole, T. J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*, 336(8730), 1519-1523.
- Lucet, J. C., Chevret, S., Decre, D., Vanjak, D., Macrez, A., Bedos, J. P., et al. (1996). Outbreak of multiply resistant *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit: Epidemiology and risk factors for acquisition. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 22(3), 430-436.
- Ludington-Hoe, S. M. & Swinth, J. Y. (1996). Developmental aspects of kangaroo care. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 25(8), 691-703.
- Lundequist, B., Nord, C. E. & Winberg, J. (1985). The composition of the faecal microflora in breastfed and bottle fed infants from birth to eight weeks. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 74(1), 45-51.
- Lusyati, S., Hulzebos, C. V., Zandvoort, J., Sukandar, H. & Sauer, P. J. (2013). Cytokines patterns in newborn infants with late onset sepsis. *Journal of Neonatal-Perinatal Medicine*, 6(2), 153-163.
- Ma, L. C., Fang, C. T., Lee, C. Z., Shun, C. T. & Wang, J. T. (2005). Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(1), 117-128.

- Macey, T. J., Harmon, R. J. & Easterbrooks, M. A. (1987). Impact of premature birth on the development of the infant in the family. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*, 55(6), 846-852.
- Mack, D. R., Ahrne, S., Hyde, L., Wei, S. & Hollingsworth, M. A. (2003). Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*, 52(6), 827-833.
- Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), 1035S-1045S.
- Macnow, T., O'Toole, D., DeLaMora, P., Murray, M., Rivera, K., Whittier, S., et al. (2013). Utility of surveillance cultures for antimicrobial resistant organisms in infants transferred to the neonatal intensive care unit. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(12), E443-E450.
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H., et al. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 97(6), F456-F462.
- Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P. & Suau, A. (2006). Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(1), 128-138.
- Maherault, A. C., Nordmann, P., Therby, A. & Pagon, B. (2012). Efficacy of imipenem for the treatment of bacteremia due to an OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(4), 577-578.
- Mahlen, S. D. & Clarridge, J. E., 3rd. (2011). Evaluation of a selection strategy before use of 16S rRNA gene sequencing for the identification of clinically significant gram-negative rods and coccobacilli. *American Journal of Clinical Pathology*, 136(3), 381-388.
- Mai, V., Torrazza, R. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Li, N., et al. (2013). Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PloS One*, 8(1), e52876.
- Mai, V., Young, C. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Casella, G., et al. (2011). Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloS One*, 6(6), e20647.
- Mangeney, N., Niel, P., Paul, G., Faubert, E., Hue, S., Dupeyron, C., et al. (2000). A 5-year epidemiological study of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a medium- and long-stay neurological unit. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 504-511.
- Marchant, E. A., Boyce, G. K., Sadarangani, M. & Lavoie, P. M. (2013). Neonatal sepsis due to coagulase-negative staphylococci. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimaraes, V., Sokol, H., Dore, J., et al. (2009). The *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiology*, 9, 123-2180-9-123.
- Marin, M. L., Arroyo, R., Jimenez, E., Gomez, A., Fernandez, L. & Rodriguez, J. M. (2009). Cold storage of human milk: Effect on its bacterial composition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(3), 343-348.
- Marques, T. M., Cryan, J. F., Shanahan, F., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P., Dinan, T. G., et al. (2013). Gut microbiota modulation and implications for host health: Dietary strategies to influence

- the gut-brain axis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 22, 239-247.
- Martin, J. A., Hamilton, B. E., Sutton, P. D., Ventura, S. J., Mathews, T. J. & Osterman, M. J. (2010). Births: Final data for 2008. *National Vital Statistics Reports : From the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*, 59(1), 1, 3-71.
- Martin, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H. & Rodriguez, J. M. (2007a). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2638-2644.
- Martin, R., Heilig, H., Zoetendal, E. G., Jimenez, E., Fernandez, L., Smidt, H., et al. (2007b). Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*, 158(1), 31-37.
- Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., Marin, M. L., Zoetendal, E. G., et al. (2009). Isolation of *Bifidobacteria* from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 965-969.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martino, D. J., Currie, H., Taylor, A., Conway, P. & Prescott, S. L. (2008). Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(1), 69-78.
- Matoba, N., Yu, Y., Mestan, K., Pearson, C., Ortiz, K., Porta, N., et al. (2009). Differential patterns of 27 cord blood immune biomarkers across gestational age. *Pediatrics*, 123(5), 1320-1328.
- McCall, E. M., Alderdice, F., Halliday, H. L., Jenkins, J. G. & Vohra, S. (2010). Interventions to prevent hypothermia at birth in preterm and/or low birthweight infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3):CD004210. doi(3), CD004210.
- McDonald, S. D., Han, Z., Mulla, S., Beyene, J. & Knowledge Synthesis Group. (2010). Overweight and obesity in mothers and risk of preterm birth and low birth weight infants: Systematic review and meta-analyses. *British Medical Journal*, 341, c3428.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Gilliam, C. H., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002a). Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(7), 1011-1012.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Saltzman, D. A., Walleit, T., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002b). Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(8), 1177-1182.
- Menon, R. (2008). Spontaneous preterm birth, a clinical dilemma: Etiologic, pathophysiologic and genetic heterogeneities and racial disparity. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 87(6), 590-600.
- Min, J., Claman, P. & Hughes, E. (2006). Society of obstetricians and gynecologists of Canada, and canadian fertility and andrology society guidelines for the number of embryos to transfer following in vitro fertilization. *J Obstet Gynaecol Can*, 28(9), 799-813.
- Miniño, A. M. & Murphy, S. L. (2012). Death in the United States, 2010. *NCHS Data Brief*, 99(10), 1-8.

- Mohan, R., Koebnick, C., Schildt, J., Mueller, M., Radke, M. & Blaut, M. (2008). Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal pH, acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. *Pediatric Research*, 64(4), 418-422.
- Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., et al. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 8(6), e66986.
- Moltó-Puigmartí, C., Castellote, A. I., Carbonell-Estrany, X. & López-Sabater, M. C. (2011). Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition*, 30(1), 116-123.
- Monasterolo, R. C., Pico, M. C., Martínez, G. R. & de Pipaón, M. S. (2013). Guía de nutrición enteral en recién nacidos de muy bajo peso. revisión sistemática de las evidencias científicas. *Grupo De Nutrición Y Metabolismo De La SEN*.
- Montagne, P., Cuillière, M. L., Molé, C., Béné, M. C. & Faure, G. (1999). Immunological and nutritional composition of human milk in relation to prematurity and mothers' parity during the first 2 weeks of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 29(1), 75-80.
- Moore, W. & Holdeman, L. V. (1974). Human fecal flora: The normal flora of 20 japanese-hawaiians. *Applied Microbiology*, 27(5), 961-979.
- Moore, E. R., Anderson, G. C., Bergman, N. & Dowswell, T. (2012). Early skin-to-skin contact for mothers and their healthy newborn infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5, CD003519.
- Moore, M. L. (2002). Preterm birth: A continuing challenge. *The Journal of Perinatal Education*, 11(4), 37-40.
- Morgan, M. E., Hart, C. A. & Cooke, R. W. (1984). *Klebsiella* infection in a neonatal intensive care unit: Role of bacteriological surveillance. *The Journal of Hospital Infection*, 5(4), 377-385.
- Morrow, A. L., Lagomarcino, A. J., Schibler, K. R., Taft, D. H., Yu, Z., Wang, B., et al. (2013). Early microbial and metabolomic signatures predict later onset of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Microbiome*, 1(1), 13-2618-1-13.
- Mosqueda, E., Sapiegiene, L., Glynn, L., Wilson-Costello, D. & Weiss, M. (2008). The early use of minimal enteral nutrition in extremely low birth weight newborns. *Journal of Perinatology*, 28(4), 264-269.
- Mshvildadze, M., Neu, J., Shuster, J., Theriaque, D., Li, N. & Mai, V. (2010). Intestinal microbial ecology in premature infants assessed with non-culture-based techniques. *The Journal of Pediatrics*, 156(1), 20-25.
- Muglia, L. J. & Katz, M. (2010). The enigma of spontaneous preterm birth. *The New England Journal of Medicine*, 362(6), 529-535.
- Mukhopadhyay, N. & Arulkumaran, S. (2007). Reproductive outcomes after *in-vitro* fertilization. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 19(2), 113-119.
- Murk, W., Risnes, K. R. & Bracken, M. B. (2011). Prenatal or early-life exposure to antibiotics and risk of childhood asthma: A systematic review. *Pediatrics*, 127(6), 1125-1138.
- Nadasy, K. A., Domiati-Saad, R. & Tribble, M. A. (2007). Invasive *Klebsiella pneumoniae* syndrome in North America. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 45(3), e25-8.
- Narayanan, I., Prakash, K., Murthy, N. S. & Gujral, V. V. (1984). Randomised controlled trial of effect of raw and holder pasteurised human milk and of formula supplements on incidence of

- neonatal infection. *Lancet*, 2(8412), 1111-1113.
- Nassif, X., Fournier, J. M., Arondel, J. & Sansonetti, P. J. (1989a). Mucoid phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infection and Immunity*, 57(2), 546-552.
- Nassif, X., Honore, N., Vasselon, T., Cole, S. T. & Sansonetti, P. J. (1989b). Positive control of colanic acid synthesis in *Escherichia coli* by *rmpA* and *rmpB*, two virulence-plasmid genes of *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Microbiology*, 3(10), 1349-1359.
- National Collaborating Centre for Women's and Children's Health UK. (2004). Caesarean section.
- Niermeyer, S., Kattwinkel, J., Van Reempts, P., Nadkarni, V., Phillips, B., Zideman, D., et al. (2000). International guidelines for neonatal resuscitation: An excerpt from the guidelines 2000 for cardiopulmonary resuscitation and emergency cardiovascular care: International consensus on science, contributors and reviewers for the neonatal resuscitation guidelines. *Pediatrics*, 106(3), E29.
- NNIS. (2000). National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-April 2000, issued June 2000. *American Journal of Infection Control*, 28(6), 429-448.
- Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 9, 228-236.
- Normann, E., Fahlen, A., Engstrand, L. & Lilja, H. E. (2013). Intestinal microbial profiles in extremely preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatrica*, 102(2), 129-136.
- Nosarti, C., Reichenberg, A., Murray, R. M., Cnattingius, S., Lambe, M. P., Yin, L., et al. (2012). Preterm birth and psychiatric disorders in young adult life. *Archives of General Psychiatry*, 69(6), E1-8.
- O'Hara, A. M. & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688-693.
- OMS. (1977). WHO: Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths. modifications recommended by FIGO as amended October 14, 1976. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 56(3), 247-253.
- OMS. (1985). Appropriate technology for birth. *Lancet*, 2(8452), 436-437.
- OMS. (2003). Guidelines for medico-legal care of victims of sexual violence. Geneva.
- OMS. (2005a). Addressing violence against women and achieving the millennium development goals. Geneva.
- OMS. (2005b). Eliminating measles and rubella and preventing congenital rubella infection: WHO European region strategic plan 2005-2010. Copenhagen.
- OMS. (2005c). The World Health Report 2005: Make every mother and child count. Geneva.
- OMS. (2009). WHO, Child growth standards and the identification of severe acute malnutrition in infants and children. Retrieved 4/12, 2014, from <http://www.who.int/childgrowth/en/>
- OMS. (2011). Overweight and obesity: Fact sheet 311. Geneva.
- OMS. (2012). Born too soon: The global action report on preterm birth. Geneva.
- OMS. (2003). Pregnancy, childbirth, postpartum, and newborn care: A guide for essential practice. Geneva.
- Oncel, M. Y., Sari, F. N., Arayici, S., Guzoglu, N., Erdevi, O., Uras, N., et al. (2014). *Lactobacillus reuteri* for the prevention of necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: A randomised controlled trial. *Archives of Disease in*

- Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 99(2), F110-5.
- O'Toole, P. W. & Claesson, M. J. (2010). Gut microbiota: Changes throughout the lifespan from infancy to elderly. *International Dairy Journal*, 20(4), 281-291.
- Ottman, N., Smidt, H., de Vos, W. M. & Belzer, C. (2012). The function of our microbiota: Who is out there and what do they do? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2, 104.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1524-1532.
- Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A. & Brown, P. O. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology*, 5(7), e177.
- Papí, A. G., Alonso, C. P. & Maldonado, J. A. (2007). El método de la madre canguro. *Acta Pediatr Esp*, 65(6), 286-291.
- Park, E., Schultz, J., Tudiver, F., Campbell, T. & Becker, L. (2004). Enhancing partner support to improve smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, 3.
- Parkinson, J. R., Hyde, M. J., Gale, C., Santhakumaran, S. & Modi, N. (2013). Preterm birth and the metabolic syndrome in adult life: A systematic review and meta-analysis. *Pediatrics*, 131(4), e1240-63.
- Patel, R. R., Steer, P., Doyle, P., Little, M. P. & Elliott, P. (2004). Does gestation vary by ethnic group? A london-based study of over 122,000 pregnancies with spontaneous onset of labour. *International Journal of Epidemiology*, 33(1), 107-113.
- Paterson, D. L. & Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
- Patole, S., Keil, A. D., Chang, A., Nathan, E., Doherty, D., Simmer, K., et al. (2014). Effect of *Bifidobacterium breve* M-16V supplementation on fecal bifidobacteria in preterm neonates: a randomised double blind placebo controlled trial. *PloS One*, 9(3), e89511.
- Peman, J., Zaragoza, R. & Salavert, M. (2013). Prevention and control of nosocomial and health-care facilities associated infections caused by species of *Candida* and other yeasts. [Control y prevención de las infecciones nosocomiales y asociadas a cuidados sanitarios causadas por especies de *Candida* y otras levaduras] *Revista Española De Quimioterapia: Publicacion Oficial De La Sociedad Española De Quimioterapia*, 26(4), 298-311.
- Pena, C., Pujol, M., Ricart, A., Ardanuy, C., Ayats, J., Linares, J., et al. (1997). Risk factors for faecal carriage of *Klebsiella pneumoniae* producing extended spectrum beta-lactamase (ESBL-KP) in the intensive care unit. *The Journal of Hospital Infection*, 35(1), 9-16.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- Peralta, G., Lamelo, M., Alvarez-Garcia, P., Velasco, M., Delgado, A., Horcajada, J. P., et al. (2012). Impact of empirical treatment in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. bacteremia. A multicentric cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 12, 245-2334-12-245.
- Pereira, G. R., Baker, L., Egler, J., Corcoran, L. & Chiavacci, R. (1990). Serum myoinositol concentrations in premature infants fed human milk, formula for infants, and parenteral nutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 51(4), 589-593.

- Perez, P. F., Dore, J., Leclerc, M., Levenez, F., Benyacoub, J., Serrant, P., et al. (2007). Bacterial imprinting of the neonatal immune system: Lessons from maternal cells? *Pediatrics*, 119(3), e724-32.
- Peskin, E. G. & Reine, G. M. (2002). A guest editorial: What is the correct cesarean rate and how do we get there? *Obstetrical & Gynecological Survey*, 57(4), 189-190.
- Petrof, E. O., Gloor, G. B., Vanner, S. J., Weese, S. J., Carter, D., Daigneault, M. C., et al. (2013). Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. *Microbiome*, 1(1), 3-2618-1-3.
- Pinto-Martin, J. A., Levy, S. E., Feldman, J. F., Lorenz, J. M., Paneth, N. & Whitaker, A. H. (2011). Prevalence of autism spectrum disorder in adolescents born weighing <2000 grams. *Pediatrics*, 128(5), 883-891.
- Pitout, J. D., Nordmann, P., Laupland, K. B. & Poirel, L. (2005). Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 52-59.
- Platt, M. J., Cans, C., Johnson, A., Surman, G., Topp, M., Torrioli, M. G., et al. (2007). Trends in cerebral palsy among infants of very low birthweight (<1500 g) or born prematurely (<32 weeks) in 16 european centres: A database study. *Lancet*, 369(9555), 43-50.
- Plunkett, J. & Muglia, L. J. (2008). Genetic contributions to preterm birth: Implications from epidemiological and genetic association studies. *Annals of Medicine*, 40(3), 167-195.
- Podschun, R., Fischer, A. & Ullmann, U. (1992). Siderophore production of *Klebsiella* species isolated from different sources. *Zentralblatt Fur Bakteriologie : International Journal of Medical Microbiology*, 276(4), 481-486.
- Podschun, R., Pietsch, S., Holler, C. & Ullmann, U. (2001). Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 3325-3327.
- Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.
- Poirel, L., Decousser, J. W. & Nordmann, P. (2003). Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*(CTX-M) beta-lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2938-2945.
- Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V. & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 15-22.
- Polin, R. A., Denson, S., Brady, M. T., Committee on Fetus and Newborn & Committee on Infectious Diseases. (2012). Epidemiology and diagnosis of health care-associated infections in the NICU. *Pediatrics*, 129(4), e1104-9.
- Premji, S. S. & Chessell, L. (2011). Continuous nasogastric milk feeding versus intermittent bolus milk feeding for premature infants less than 1500 grams. *Cochrane Database Syst Rev*, 11.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
- Quigley, M. A., Henderson, G., Anthony, M. Y. & McGuire, W. (2007). Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4)(4), CD002971.
- Quigley, M. A., Poulsen, G., Boyle, E., Wolke, D., Field, D., Alfirevic, Z., et al. (2012). Early term and late preterm birth are associated with

- poorer school performance at age 5 years: A cohort study. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 97(3), F167-73.
- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., et al. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: Analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1736-1751.
- Ramphal, R. & Ambrose, P. G. (2006). Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: Current data. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42 Suppl 4, S164-72.
- Rautava, S., Luoto, R., Salminen, S. & Isolauri, E. (2012). Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 9(10), 565-576.
- Raymond, K. N., Dertz, E. A. & Kim, S. S. (2003). Enterobactin: An archetype for microbial iron transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3584-3588.
- Regue, M., Hita, B., Pique, N., Izquierdo, L., Merino, S., Fresno, S., et al. (2004). A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. *Infection and Immunity*, 72(1), 54-61.
- Reid, G. (2001). Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. *Background Paper for FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria. Cordoba, Argentina*, 1-4.
- Renz, H., Brandtzaeg, P. & Hornef, M. (2012). The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 12(1), 9-23.
- Requejo, J., Althabe, F., Merialdi, M., Keller, K., Katz, J. & Menon, R. (2013). Born too soon: Care during pregnancy and childbirth to reduce preterm deliveries and improve health outcomes of the preterm baby. *Reprod Health*, 10(Suppl 1), S4.
- Rettedal, S., Lohr, I. H., Natas, O., Giske, C. G., Sundsfjord, A. & Oymar, K. (2012). First outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a norwegian neonatal intensive care unit; associated with contaminated breast milk and resolved by strict cohorting. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 120(8), 612-621.
- Reyes, A., Haynes, M., Hanson, N., Angly, F. E., Heath, A. C., Rohwer, F., et al. (2010). Viruses in the faecal microbiota of monozygotic twins and their mothers. *Nature*, 466(7304), 334-338.
- Riley, M. A., Pinou, T., Wertz, J. E., Tan, Y. & Valletta, C. M. (2001). Molecular characterization of the klebicin B plasmid of *Klebsiella pneumoniae*. *Plasmid*, 45(3), 209-221.
- Rock, C. L., Flatt, S. W., Sherwood, N. E., Karanja, N., Pakiz, B. & Thomson, C. A. (2010). Effect of a free prepared meal and incentivized weight loss program on weight loss and weight loss maintenance in obese and overweight women: A randomized controlled trial. *JAMA*, 304(16), 1803-1810.
- Rodríguez Vicente, J. (2010). Guía de la buena práctica clínica en infecciones de transmisión sexual. *Madrid: Organización Médica Colegial*.
- Rodriguez, N. A., Meier, P. P., Groer, M. W., Zeller, J. M., Engstrom, J. L. & Fogg, L. (2010). A pilot study to determine the safety and feasibility of oropharyngeal administration of own mother's colostrum to extremely low-birth-weight infants. *Advances in Neonatal Care: Official Journal of the National Association of Neonatal Nurses*, 10(4), 206-212.

- Roger, L. C., Costabile, A., Holland, D. T., Hoyles, L. & McCartney, A. L. (2010). Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology*, 156(11), 3329-3341.
- Rogosch, T., Kerzel, S., Hoss, K., Hoersch, G., Zemlin, C., Heckmann, M., et al. (2012). IgA response in preterm neonates shows little evidence of antigen-driven selection. *Journal of Immunology*, 189(11), 5449-5456.
- Romero, R., Nicolaides, K., Conde-Agudelo, A., Tabor, A., O'Brien, J. M., Cetingoz, E., et al. (2012). Vaginal progesterone in women with an asymptomatic sonographic short cervix in the midtrimester decreases preterm delivery and neonatal morbidity: A systematic review and metaanalysis of individual patient data. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 206(2), 124. e1-124. e19.
- Rønnestad, A., Abrahamsen, T. G., Medbo, S., Reigstad, H., Lossius, K., Kaaresen, P. I., et al. (2005). Late-onset septicemia in a norwegian national cohort of extremely premature infants receiving very early full human milk feeding. *Pediatrics*, 115(3), e269-76.
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J. & Martínez-Romero, E. (2004). *Klebsiella variicola*, A novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*, 27(1), 27-35.
- Rosenthal, S. & Tager, I. B. (1975). Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. *Annals of Internal Medicine*, 83(3), 355-357.
- Rotteveel, J., van Weissenbruch, M. M., Twisk, J. W. & Delemarre-Van de Waal, H. A. (2008). Infant and childhood growth patterns, insulin sensitivity, and blood pressure in prematurely born young adults. *Pediatrics*, 122(2), 313-321.
- Rouge, C., Goldenberg, O., Ferraris, L., Berger, B., Rochat, F., Legrand, A., et al. (2010). Investigation of the intestinal microbiota in preterm infants using different methods. *Anaerobe*, 16(4), 362-370.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A. & Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 333-335.
- Rupp, M. E. & Fey, P. D. (2003). Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, 63(4), 353-365.
- Sacker, A., Quigley, M. A. & Kelly, Y. J. (2006). Breastfeeding and developmental delay: Findings from the millennium cohort study. *Pediatrics*, 118(3), e682-9.
- Saigal, S., Burrows, E., Stoskopf, B. L., Rosenbaum, P. L. & Streiner, D. (2000). Impact of extreme prematurity on families of adolescent children. *The Journal of Pediatrics*, 137(5), 701-706.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sakata, H., Yoshioka, H. & Fujita, K. (1985a). Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European Journal of Pediatrics*, 144(2), 186-190.
- Sakata, H., Yoshioka, H. & Fujita, K. (1985b). Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *European Journal of Pediatrics*, 144(2), 186-190.
- Sakurai, M., Itabashi, K., Sato, Y., Hibino, S. & Mizuno, K. (2008). Extrauterine growth restriction in preterm infants of gestational age < or = 32 weeks. *Pediatrics International : Official Journal of the Japan Pediatric Society*, 50(1), 70-75.

- Sanz, Y., Collado, M., Haros, M. & Dalmau, J. (2004). Funciones metabólico-nutritivas de la microbiota intestinal y su modulación a través de la dieta: Probióticos y prebióticos. *Acta Pediatr Esp*, 62, 520-526.
- Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S. & Isolauri, E. (2009). *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* DNA in the human placenta. *Letters in Applied Microbiology*, 48(1), 8-12.
- Saurel-Cubizolles, M. J., Zeitlin, J., Lelong, N., Papiernik, E., Di Renzo, G. C., Breart, G., et al. (2004). Employment, working conditions, and preterm birth: Results from the europop case-control survey. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 58(5), 395-401.
- Savage, D. C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31, 107-133.
- Schanler, R. J. (2011). Outcomes of human milk-fed premature infants. *Seminars in Perinatology*, 35(1), 29-33.
- Schanler, R. J., Lau, C., Hurst, N. M. & Smith, E. O. (2005). Randomized trial of donor human milk versus preterm formula as substitutes for mothers' own milk in the feeding of extremely premature infants. *Pediatrics*, 116(2), 400-406.
- Schanler, R. J., Shulman, R. J. & Lau, C. (1999). Feeding strategies for premature infants: Beneficial outcomes of feeding fortified human milk versus preterm formula. *Pediatrics*, 103(6), 1150-1157.
- Schanler, R. J. (2000). Overview: The clinical perspective. *The Journal of Nutrition*, 130(2S Suppl), 417S-419S.
- Schanler, R. J. (2007). Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 625S-628S.
- Schiappa, D. A., Hayden, M. K., Matushek, M. G., Hashemi, F. N., Sullivan, J., Smith, K. Y., et al. (1996). Ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bloodstream infection: A case-control and molecular epidemiologic investigation. *The Journal of Infectious Diseases*, 174(3), 529-536.
- Schirbel, A., Kessler, S., Rieder, F., West, G., Rebert, N., Asosingh, K., et al. (2013). Pro-angiogenic activity of TLRs and NLRs: A novel link between gut microbiota and intestinal angiogenesis. *Gastroenterology*, 144(3), 613-623.e9.
- Schnabl, K. L., Van Aerde, J. E., Thomson, A. B. & Clandinin, M. T. (2008). Necrotizing enterocolitis: A multifactorial disease with no cure. *World Journal of Gastroenterology*, 14(14), 2142-2161.
- Schoenborn, C. A. & Horm, J. (1993). Negative moods as correlates of smoking and heavier drinking: Implications for health promotion. *Advance Data*, 236, 1-16.
- Scholtens, P. A., Oozeer, R., Martin, R., Amor, K. B. & Knol, J. (2012). The early settlers: Intestinal microbiology in early life. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3, 425-447.
- Schubert, S., Cuenca, S., Fischer, D. & Heesemann, J. (2000). High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in *Enterobacteriaceae* isolated from blood cultures and urine samples: Prevalence and functional expression. *The Journal of Infectious Diseases*, 182(4), 1268-1271.
- Schumann, A., Nutten, S., Donnicola, D., Comelli, E. M., Mansourian, R., Cherbut, C., et al. (2005). Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiological Genomics*, 23(2), 235-245.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Lobnitz, M., Michel, P., Radke, M. & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research*, 54(3), 393-399.

- Senterre, T. & Rigo, J. (2011). Optimizing early nutritional support based on recent recommendations in VLBW infants and postnatal growth restriction. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 536-542.
- Shah, B. A. & Padbury, J. F. (2014). Neonatal sepsis an old problem with new insights. *Virulence*, 5(1).
- Shah, P. S. & Zao, J. (2009). Induced termination of pregnancy and low birthweight and preterm birth: A systematic review and meta-analyses. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 116(11), 1425-1442.
- Shanahan, F. (2004). Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 10(7), S16-S24.
- Shane, A. L. & Stoll, B. J. (2014). Neonatal sepsis: Progress towards improved outcomes. *Journal of Infection*, 68, S24-S32.
- Shapiro-Mendoza, C. K., Tomashek, K. M., Kotelchuck, M., Barfield, W., Nannini, A., Weiss, J., et al. (2008). Effect of late-preterm birth and maternal medical conditions on newborn morbidity risk. *Pediatrics*, 121(2), e223-32.
- Sharps, P. W., Laughon, K. & Giangrande, S. K. (2007). Intimate partner violence and the childbearing year: Maternal and infant health consequences. *Trauma, Violence & Abuse*, 8(2), 105-116.
- Shortt, C. (1999). The probiotic century: Historical and current perspectives. *Trends in Food Science & Technology*, 10(12), 411-417.
- Siggers, R. H., Siggers, J., Thymann, T., Boye, M. & Sangild, P. T. (2011). Nutritional modulation of the gut microbiota and immune system in preterm neonates susceptible to necrotizing enterocolitis. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 22(6), 511-521.
- Sim, K., Powell, E., Shaw, A. G., McClure, Z., Bangham, M. & Kroll, J. S. (2013). The neonatal gastrointestinal microbiota: The foundation of future health? *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(4), F362-4.
- Simonsen, K. A., Anderson-Berry, A. L., Delair, S. F. & Davies, H. D. (2014). Early-onset neonatal sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1), 21-47.
- Singer, L. T., Fulton, S., Davillier, M., Koshy, D., Salvator, A. & Baley, J. E. (2003). Effects of infant risk status and maternal psychological distress on maternal-infant interactions during the first year of life. *Journal of Developmental & Behavioral Pediatrics*, 24(4), 233-241.
- Singer, L. T., Salvator, A., Guo, S., Collin, M., Lilien, L. & Baley, J. (1999). Maternal psychological distress and parenting stress after the birth of a very low-birth-weight infant. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(9), 799-805.
- Singhal, A., Cole, T. J. & Lucas, A. (2001). Early nutrition in preterm infants and later blood pressure: Two cohorts after randomised trials. *The Lancet*, 357(9254), 413-419.
- Singhal, A., Cole, T. J., Fewtrell, M., Deanfield, J. & Lucas, A. (2004). Is slower early growth beneficial for long-term cardiovascular health? *Circulation*, 109(9), 1108-1113.
- Sisk, P. M., Lovelady, C. A., Dillard, R. G., Gruber, K. J. & O'Shea, T. M. (2007). Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 27(7), 428-433.
- Smith Moland, E., Hanson, N. D., Herrera, V. L., Black, J. A., Lockhart, T. J., Hossain, A., et al. (2003). Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(3), 711-714.
- Sommer, F. & Bäckhed, F. (2013). The gut microbiota: masters of host development and physiology. *Nature*

- Reviews Microbiology*, 11(4), 227-238.
- Soto, A., Martin, V., Jimenez, E., Mader, I., Rodriguez, J. M. & Fernandez, L. (2014). Lactobacilli and Bifidobacteria in human breast milk: Influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, Epub ahead of print.
- Stark, P. L. & Lee, A. (1982). The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *Journal of Medical Microbiology*, 15(2), 189-203.
- Steer, P. (2005). The epidemiology of preterm labour. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 112(Suppl 1), 1-3.
- Stockinger, S., Hornef, M. W. & Chassin, C. (2011). Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 68(22), 3699-3712.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Adams-Chapman, I., Fanaroff, A. A., Hintz, S. R., Vohr, B., et al. (2004). Neurodevelopmental and growth impairment among extremely low-birth-weight infants with neonatal infection. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 292(19), 2357-2365.
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Shankaran, S., Laptook, A. R., Walsh, M. C., et al. (2010). Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD neonatal research network. *Pediatrics*, 126(3), 443-456.
- Suzuki, K., Ha, S. A., Tsuji, M. & Fagarasan, S. (2007). Intestinal IgA synthesis: A primitive form of adaptive immunity that regulates microbial communities in the gut. *Seminars in Immunology*, 19(2), 127-135.
- Swamy, G. K., Ostbye, T. & Skjaerven, R. (2008). Association of preterm birth with long-term survival, reproduction, and next-generation preterm birth. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 299(12), 1429-1436.
- Swiatczak, B. & Rescigno, M. (2012). How the interplay between antigen presenting cells and microbiota tunes host immune responses in the gut. *Seminars in Immunology*, 24(1), 43-49.
- Szylit, O., Maurage, C., Gasqui, P., Popot, F., Favre, A., Gold, F., et al. (1998). Fecal short-chain fatty acids predict digestive disorders in premature infants. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 22(3), 136-141.
- Talge, N. M., Holzman, C., Wang, J., Lucia, V., Gardiner, J. & Breslau, N. (2010). Late-preterm birth and its association with cognitive and socioemotional outcomes at 6 years of age. *Pediatrics*, 126(6), 1124-1131.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599.
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., et al. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *Immunology and Medical Microbiology*, 56(1), 80-87.
- Tannock, G. W. (1995). Microecology of the gastrointestinal tract in relation to lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 5(8), 1059-1070.
- Taylor, H. G., Klein, N., Minich, N. M. & Hack, M. (2001). Long-term family outcomes for children with very low birth weights. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 155(2), 155-161.
- Thom, B. T. (1970). *Klebsiella* in faeces. *Lancet*, 2(7681), 1033.
- Thomas, S. V., Indrani, L., Devi, G. C., Jacob, S., Beegum, J., Jacob, P. P., et al. (2001). Pregnancy in women with epilepsy: Preliminary results of kerala registry of epilepsy and pregnancy. *Neurology India*, 49(1), 60-66.

- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Thompson, A. M. & Bizzarro, M. J. (2008). Necrotizing enterocolitis in newborns: Pathogenesis, prevention and management. *Drugs*, 68(9), 1227-1238.
- Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (etat normal et pathologique). *University of Paris: Paris, France*.
- Tomicic, S., Johansson, G., Voor, T., Bjorksten, B., Bottcher, M. F. & Jenmalm, M. C. (2010). Breast milk cytokine and IgA composition differ in estonian and swedish mothers-relationship to microbial pressure and infant allergy. *Pediatric Research*, 68(4), 330-334.
- Torloni, M. R., Betrán, A. P., Daher, S., Widmer, M., Dolan, S. M., Menon, R., et al. (2009). Maternal BMI and preterm birth: A systematic review of the literature with meta-analysis. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 22(11), 957-970.
- Torloni, M. R., Fortunato, S. J., Betrán, A. P., Williams, S., Brou, L., Drobek, C. O., et al. (2012). Ethnic disparity in spontaneous preterm birth and maternal pre-pregnancy body mass index. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(4), 959-966.
- Torrazza, R. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sharma, R., Hudak, M. L., Neu, J., et al. (2013). Intestinal microbial ecology and environmental factors affecting necrotizing enterocolitis. *PloS One*, 8(12), e83304.
- Trevisanuto, D., Doglioni, N., Cavallin, F., Parotto, M., Micaglio, M. & Zanardo, V. (2010). Heat loss prevention in very preterm infants in delivery rooms: A prospective, randomized, controlled trial of polyethylene caps. *The Journal of Pediatrics*, 156(6), 914-917.
- Tsay, R., Siu, L., Fung, C. & Chang, F. (2002). Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: Risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Archives of Internal Medicine*, 162(9), 1021-1027.
- Tsikouras, P., Dafopoulos, A., Trypsianis, G., Vrachnis, N., Bouchlariotou, S., Liatsikos, S. A., et al. (2012). Pregnancies and their obstetric outcome in two selected age groups of teenage women in greece. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 25(9), 1606-1611.
- Tsui, A. O., McDonald-Mosley, R. & Burke, A. E. (2010). Family planning and the burden of unintended pregnancies. *Epidemiologic Reviews*, 32(1), 152-174.
- Tudehope, D. I. (2013). Human milk and the nutritional needs of preterm infants. *The Journal of Pediatrics*, 162(Suppl 3), S17-S25.
- Tully, D. B., Jones, F. & Tully, M. R. (2001). Donor milk: What's in it and what's not. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 17(2), 152-155.
- Turroni, F., Peano, C., Pass, D. A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M. J., et al. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PloS One*, 7(5), e36957.
- Umeh, O. & Berkowitz, L. B. (2013). *Klebsiella infections*. *E-medicine*. Retrieved May/2013, 2013, from <http://emedicine.medscape.com/article/219907-overview>
- Ursell, L. K., Clemente, J. C., Rideout, J. R., Gevers, D., Caporaso, J. G. & Knight, R. (2012). The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 129(5), 1204-1208.
- Utrera Torres, M. I., Medina Lopez, C., Vazquez Roman, S., Alonso Diaz, C.,

- Cruz-Rojo, J., Fernandez Cooke, E., et al. (2010). Does opening a milk bank in a neonatal unit change infant feeding practices? A before and after study. *International Breastfeeding Journal*, 5(4).
- Vain, N. E. & Barrington, K. J. (2012). Feasibility of evaluating treatment of early hypotension in extremely low birth weight infants. *The Journal of Pediatrics*, 161(1), 4-7.
- Valverde, A., Coque, T. M., Garcia-San Miguel, L., Baquero, F. & Canton, R. (2008). Complex molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: A long-term perspective from a single institution in Madrid. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(1), 64-72.
- van Belkum, A., Struelens, M., de Visser, A., Verbrugh, H. & Tibayrenc, M. (2001). Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(3), 547-560.
- van Beusekom, C. M., Zeegers, T. A., Martini, I. A., Velvis, H. J., Visser, G. H., van Doormaal, J. J., et al. (1993). Milk of patients with tightly controlled insulin-dependent diabetes mellitus has normal macronutrient and fatty acid composition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(6), 938-943.
- van den Braak, N., Power, E., Anthony, R., Endtz, H. P., Verbrugh, H. A. & van Belkum, A. (2000). Random amplification of polymorphic DNA versus pulsed field gel electrophoresis of *SmaI* DNA macrorestriction fragments for typing strains of vancomycin-resistant enterococci. *FEMS Microbiology Letters*, 192(1), 45-52.
- van Nood, E., Vrieze, A., Nieuwdorp, M., Fuentes, S., Zoetendal, E. G., de Vos, W. M., et al. (2013). Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *The New England Journal of Medicine*, 368(5), 407-415.
- Vázquez Román, S., Alonso Díaz, C., Medina López, C., Bustos Lozano, G., Martínez Hidalgo, M. & Pallás Alonso, C. (2009). Puesta en marcha del banco de leche materna donada en una unidad neonatal. *Anales De Pediatría*, 71(4), 343-348.
- Vitali, B., Cruciani, F., Baldassarre, M. E., Capursi, T., Spisni, E., Valerii, M. C., et al. (2012). Dietary supplementation with probiotics during late pregnancy: Outcome on vaginal microbiota and cytokine secretion. *BMC Microbiology*, 12, 236-2180-12-236.
- Wadhwa, P. D., Culhane, J. F., Rauh, V. & Barve, S. S. (2001). Stress and preterm birth: Neuroendocrine, immune/inflammatory, and vascular mechanisms. *Maternal and Child Health Journal*, 5(2), 119-125.
- Walker, W. A. (2008). Mechanisms of action of probiotics. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 46 (Suppl 2), S87-91; discussion S144-51.
- Wandersman, C. & Delepeleire, P. (2004). Bacterial iron sources: From siderophores to hemophores. *Annual Review of Microbiology*, 58, 611-647.
- Wang, Q., Dong, J. & Zhu, Y. (2012). Probiotic supplement reduces risk of necrotizing enterocolitis and mortality in preterm very low-birth-weight infants: An updated meta-analysis of 20 randomized, controlled trials. *Journal of Pediatric Surgery*, 47(1), 241-248.
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I. & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: A functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, 13(1), 116.
- Wasserheit, J. N. & Aral, S. O. (1996). The dynamic topology of sexually transmitted disease epidemics: Implications for prevention strategies. *The Journal of Infectious Diseases*, 174 (Suppl 2), S201-213.
- Weil, O. & Fernández, H. (1999). Is safe motherhood an orphan initiative? *The Lancet*, 354(9182), 940-943.

- Weng, M. & Walker, W. (2013). The role of gut microbiota in programming the immune phenotype. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 4(3), 203-214.
- Westerbeek, E. A. M., van den Berg, A., Lafeber, H. N., Knol, J., Fetter, W. P. F. & van Elburg, R. M. (2006). The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clinical Nutrition*, 25(3), 361-368.
- White, R. A., Bjørnholt, J. V., Baird, D. D., Midtvedt, T., Harris, J. R., Pagano, M., et al. (2013). Novel developmental analyses identify longitudinal patterns of early gut microbiota that affect infant growth. *PLoS Computational Biology*, 9(5), e1003042.
- Wiener, J., Quinn, J. P., Bradford, P. A., Goering, R. V., Nathan, C., Bush, K., et al. (1999). Multiple antibiotic-resistant *Klebsiella* and *Escherichia coli* in nursing homes. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 281(6), 517-523.
- Wight, N., Morton, J. & Kim, J. (2008). Managing breastfeeding in the NICU. *Best Medicine: Human Milk in the NICU*, 111-135.
- Wilks, M. (2007). Bacteria and early human development. *Early Human Development*, 83(3), 165-170.
- Williams, P., Ciurana, B., Camprubi, S. & Tomas, J. M. (1990). Influence of lipopolysaccharide chemotype on the interaction between *Klebsiella pneumoniae* and human polymorphonuclear leucocytes. *FEMS Microbiology Letters*, 57(3), 305-309.
- Woodmansey, E. J. (2007). Intestinal bacteria and ageing. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1178-1186.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., et al. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052), 105-108.
- Xu, J. & Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10452-10459.
- Yan, J. J., Ko, W. C. & Wu, J. J. (2001). Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo-beta-lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(8), 2368-2371.
- Yang, S., Li, W., Challis, J. R., Reid, G., Kim, S. O. & Bocking, A. D. (2014). Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 supernatant prevents lipopolysaccharide-induced preterm birth and reduces inflammation in pregnant CD-1 mice. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, in press.
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227.
- Yeh, K. M., Chang, F. Y., Fung, C. P., Lin, J. C. & Siu, L. K. (2006). *magA* is not a specific virulence gene for *Klebsiella pneumoniae* strains causing liver abscess but is part of the capsular polysaccharide gene cluster of *K. pneumoniae* serotype K1. *Journal of Medical Microbiology*, 55(6), 803-804.
- Yeh, K. M., Kurup, A., Siu, L. K., Koh, Y. L., Fung, C. P., Lin, J. C., et al. (2007). Capsular serotype K1 or K2, rather than *magA* and *rmpA*, is a major virulence determinant for *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in singapore and taiwan. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(2), 466-471.
- Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., et al. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial*

- Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151-1161.
- Yonkers, K. A., Wisner, K. L., Stewart, D. E., Oberlander, T. F., Dell, D. L., Stotland, N., et al. (2009). The management of depression during pregnancy: A report from the american psychiatric association and the american college of obstetricians and gynecologists. *General Hospital Psychiatry*, 31(5), 403-413.
- Yu, W. L., Ko, W. C., Cheng, K. C., Lee, H. C., Ke, D. S., Lee, C. C., et al. (2006). Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(10), 1351-1358.
- Zaidi, A. K., Huskins, W. C., Thaver, D., Bhutta, Z. A., Abbas, Z. & Goldmann, D. A. (2005). Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. *Lancet*, 365(9465), 1175-1188.
- Zeitlin, J., Saurel-Cubizolles, M. J., De Mouzon, J., Rivera, L., Ancel, P. Y., Blondel, B., et al. (2002). Fetal sex and preterm birth: Are males at greater risk? *Human Reproduction*, 17(10), 2762-2768.
- Zhang, Z., Adelman, A. S., Rai, D., Boettcher, J. & Lonnerdal, B. (2013). Amino acid profiles in term and preterm human milk through lactation: A systematic review. *Nutrients*, 5(12), 4800-4821.
- Zhou, Y., Gao, H., Mihindukulasuriya, K. A., La Rosa, P. S., Wylie, K. M., Vishnivetskaya, T., et al. (2013). Biogeography of the ecosystems of the healthy human body. *Genome Biol*, 14(1), R1.
- Ziegler, E. E. (2011). Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 58(Suppl 1), 8-18.
- Ziegler, E. E., Thureen, P. J. & Carlson, S. J. (2002). Aggressive nutrition of the very low birthweight infant. *Clinics in Perinatology*, 29(2), 225-244.
- Zuckerman, B., Amaro, H., Bauchner, H. & Cabral, H. (1989). Depressive symptoms during pregnancy: Relationship to poor health behaviors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 160(5), 1107-1111.

X. RESUMEN AMPLIADO¹

¹Este resumen ampliado se presenta en cumplimiento de las directrices de la normativa de desarrollo del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, que regula los estudios de doctorado en la Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº 14, de 21 de diciembre de 2012) y de acuerdo con las especificaciones establecidas por la Comisión de Doctorado de la UCM.

X.1 INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera recién nacido (RN) prematuro o pretérmino a aquel nacido antes de las 37 semanas de edad gestacional (EG), existiendo varias clasificaciones según la EG y el peso al nacer, dos parámetros claves para determinar el pronóstico y los cuidados que deben recibir estos niños (OMS, 1977). Los RN prematuros son inmaduros en comparación con los nacidos a término, por lo que necesitan apoyo adicional para sobrevivir fuera del útero materno y, en consecuencia, suelen ingresar en una unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN). Cada año, más del 10% de los nacimientos corresponden a RN prematuros (OMS, 2012). Un número relativamente elevado de ellos muere al poco de nacer y, de los restantes, una gran proporción requiere atención especial y/o pueden padecer secuelas, lo que conlleva un gran coste emocional y económico (Blencowe et al., 2012).

Existen algunos factores que se relacionan con una mayor probabilidad de parto prematuro (PPT) aunque también es cierto que muchos de los RN prematuro no tienen antecedentes claros. La identificación de factores de riesgo del PPT antes de la concepción o durante del embarazo podría ayudar a prevenir este problema. Tras el nacimiento, el RN prematuro puede presentar diversas complicaciones a corto, medio y largo plazo, las cuales pueden tener una evolución y pronóstico muy diferente según el medio donde se haya producido el PPT (Blencowe et al., 2013).

En nuestro entorno, el manejo de los niños prematuros ha mejorado notablemente en las últimas décadas gracias a los avances científicos y tecnológicos, un hecho que se ha traducido en una disminución espectacular en las tasas de mortalidad y morbilidad, incluso en niños con edades gestacionales muy bajas (<26 semanas) (Beck et al., 2010). Dentro del manejo de estos niños, la alimentación es uno de los aspectos más relevantes para lograr un desarrollo posnatal adecuado. Existen diversas intervenciones nutricionales tempranas (nutrición parenteral precoz, nutrición enteral trófica, fortificación) cuyo objetivo es evitar la subnutrición y disminuir el número de pacientes con peso, longitud y perímetro cefálico por debajo de los valores esperados para su edad corregida (Klingenberg et al., 2012). La nutrición enteral mínima pretende facilitar la maduración estructural, funcional y microbiana de un intestino inmaduro mediante la administración de pequeñas cantidades de leche, además de la nutrición parenteral suministrada rutinariamente (Cilieborg et al., 2012).

Actualmente existen evidencias sólidas que demuestran que la leche materna (fortificada cuando sea necesario) es la mejor opción para los niños de cualquier EG, incluyendo los prematuros; de hecho, es precisamente en esta subpoblación en la que, sus beneficios antiinfecciosos, inmunológicos, neurológicos, emocionales y económicos adquieren especial relevancia (Agostoni et al., 2009; Eidelman, 2012; Lee da et al., 2012; Schanler, 2011; Schanler, 2007; Wight et al., 2008). Probablemente, estos efectos sean debidos a la acción combinada de los nutrientes y una gran variedad de factores bioactivos presentes en el calostro y la leche materna, tales como inmunoglobulinas, células inmunocompetentes, ácidos grasos antimicrobianos, poliaminas, oligosacáridos, lisozima, lactoferrina y otras glicoproteínas, péptidos antimicrobianos y bacterias comensales y potencialmente probióticas (Ballard y Morrow, 2013; Fernandez et al., 2013). Recientemente se ha observado que el calostro de madres de RN muy prematuros poseían concentraciones de diversos componentes

inmunológicos (incluyendo inmunoglobulina (Ig) A, interleuquina (IL)-6, el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), IL-4, IL-17, la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1), la proteína inflamatoria de macrófagos-1 β (MIP-1 β), IL-5, IL-7 o el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), más elevadas que las observadas en muestras de calostro de mujeres con embarazos a término (Espinosa-Martos et al., 2013).

Por otro lado, la leche materna donada por otras madres (LMD) se convierte en la mejor alternativa si, por cualquier motivo, no se dispone de leche de la propia madre (American Academy of Pediatrics, 2012; Arslanoglu et al., 2013). Por todos los beneficios probados y potenciales de la LMD, parece que es el momento de fomentar su uso para que se convierta en el estándar de alimentación de aquellos neonatos de riesgo alto para los que no se disponga de leche de su propia madre (García-Lara et al., 2012). Gran parte de las muestras biológicas analizadas en esta Tesis Doctoral se obtuvieron en el Servicio de Neonatología del Hospital 12 de Octubre de Madrid, que fue el primero en España en disponer de un Banco de Leche con gestión pública. La administración de la LMD se hace siempre bajo prescripción médica y los receptores habituales son los niños prematuros menores de 32 semanas de gestación o menores de 1.500 g, cuyas madres no pueden proporcionar suficiente leche por diferentes razones.

En el RN prematuro extremo, la leche humana sin fortificar puede resultar suficiente en las dos primeras semanas de vida pero, posteriormente, suele ser nutricionalmente insuficiente por el déficit de proteínas, calcio, fósforo y sodio, por lo que debe ser complementada (Henderson, 2005). Con su uso, el pretérmino menor de 32 semanas consigue una mayor velocidad de crecimiento y masa ósea. Los fortificantes de leche humana son productos en polvo o líquidos con diferentes composiciones. Todos contienen proteínas o aminoácidos, carbohidratos, minerales y vitaminas en diferentes cantidades, con el objetivo de que la leche humana complementada aporte entre 80 y 85 kcal/100 ml y mayor cantidad de sodio, calcio y fósforo (Bustos, 2008). Habitualmente se utilizan una vez que se ha alcanzado la alimentación enteral exclusiva con buena tolerancia. Las fórmulas infantiles representan la tercera opción, en orden de prioridad, para la alimentación de los RN prematuros y únicamente se deberían emplear cuando no sean posibles la alimentación con leche de la propia madre o LMD.

La progresión del RN pretérmino hacia el ideal de alimentarse completamente a través del pecho de su propia madre puede pasar por una serie de etapas en las que se deban utilizar diferentes formas de nutrición: parenteral, enteral y oral. La nutrición parenteral a través de una vía central o periférica es necesaria cuando no es posible la alimentación por ninguna otra vía y su mayor inconveniente es el alto riesgo de infección que conlleva. La nutrición enteral se refiere a la administración intragástrica de cualquier líquido o alimento a través de una sonda nasogástrica (SNG) u orogástrica. Esta técnica se aplica en los menores de 32 semanas, pero se puede extender hasta las 34 - 35 semanas, dependiendo del estado de desarrollo (Bustos, 2008). No es conveniente que la alimentación continua se mantenga durante más de 4 horas porque los lípidos se adhieren a las paredes del tubo, disminuyendo su aporte. La alimentación fraccionada, dejando períodos de ayuno, parece acortar el tiempo en el que se alcanza la nutrición enteral completa en los pretérmino (Premji y Chessell, 2011).

El microbioma intestinal se encarga de toda una serie de funciones que, afortunadamente, nuestras células eucariotas no han tenido que adquirir durante el proceso evolutivo (Qin et al., 2010; Xu y Gordon, 2003). La microbiota intestinal humana contiene virus, bacterias, arqueas, mohos, levaduras, protozoos y nematodos, y no está aislada sino que se halla en una compleja y constante interacción bioquímica-inmunológica-neurológica con el resto de células y sustancias existentes en el intestino. Al nivel de filo, la microbiota de un adulto sano muestra una diversidad relativamente baja, ya que los representantes de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* constituyen más del 80% de la misma, mientras que *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia* se encuentran en porcentajes mucho menores (Arumugam et al., 2011; Yatsunencko et al., 2012). Sin embargo, la microbiota intestinal posee una elevada diversidad si se consideran niveles taxonómicos más bajos (especie y cepa), albergando centenares de especies (con una media de más de 150 por individuo) y miles de cepas y mostrando una elevada variabilidad individual (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Qin et al., 2010).

El establecimiento de la microbiota intestinal es un proceso progresivo pero, a pesar de que ha sido el objeto de numerosos estudios en adultos, sólo recientemente se han iniciado investigaciones para conocer su evolución desde la infancia hasta la tercera edad. La colonización bacteriana del intestino humano es un proceso complejo que se inicia, a pequeña escala, en las últimas fases del periodo fetal. Tras el nacimiento, se intensifica drásticamente debido al contacto del neonato con microorganismos procedentes de las microbiotas vaginal, intestinal y/o mamaria de la madre, y del medio ambiente que le rodea (Buddington et al., 2010; Mackie et al., 1999; Martin et al., 2007; Martin et al., 2009). En consecuencia, diversos factores, como la composición de la microbiota materna, la EG, la forma y lugar de nacimiento, la medicación (particularmente los antibióticos) o la alimentación, juegan papeles claves en un proceso del que dependen funciones tan importantes como la absorción de nutrientes, la formación de una barrera frente a patógenos o el desarrollo del sistema inmunitario (Hooper y Gordon, 2001; Martino et al., 2008). Actualmente, existe un gran interés por conocer el desarrollo de la microbiota del tracto gastrointestinal infantil y su influencia sobre el transcriptoma, el proteoma y/o el metaboloma del niño. No obstante, los conocimientos sobre este tema son escasos y este hecho se acentúa particularmente en el caso de los niños prematuros (Schwiertz et al., 2003).

La inmadurez del RN prematuro se manifiesta, principalmente, por su incapacidad para mantener la temperatura corporal, la predisposición a infecciones, las dificultades respiratorias, la falta de reflejos necesarios para su supervivencia (como el de búsqueda, el de succión o el de deglución) y la intolerancia digestiva a alimentos que no sean la leche humana. No obstante, los avances en neonatología han conseguido reducir la mortalidad y morbilidad de los neonatos prematuros de forma significativa en los países desarrollados. Aún así, los RN prematuros están sometidos a múltiples factores que pueden alterar el proceso de colonización del intestino, incluyendo el tratamiento antibiótico a la madre inmediatamente antes del parto (por sospecha de corioamnionitis, por rotura prematura de membranas o por colonización recto-vaginal por *Streptococcus agalactiae*), el tratamiento empírico con antibióticos tras el nacimiento (Madan et al., 2012; Schumann et al., 2005), la mayor frecuencia de parto por cesárea (nuevamente con administración de antibiótico a la madre), la separación de la madre, las maniobras invasivas (SNG, tubos endotraqueales, accesos vasculares) y la estancia prolongada en la UCIN con una elevada prevalencia de

microorganismos hospitalarios potencialmente patógenos (Westerbeek et al., 2006). En cualquier caso, los escasos trabajos publicados hasta la fecha sugieren que todos estos factores provocan una gran distorsión en el patrón de colonización del intestino neonatal, que se suele definir como aberrante, con consecuencias negativas para la pareja madre-hijo (Tanaka et al., 2009; Barrett et al., 2013). En general, estas alteraciones se caracterizan por un aumento en la prevalencia de bacterias potencialmente patógenas, una alta variabilidad entre los individuos y una menor diversidad microbiana con respecto a los niños nacidos a término (Chang et al., 2011; Jacquot et al., 2011). La microbiota de los niños prematuros suele mostrar una disminución de lactobacilos y de anaerobios estrictos, como *Bifidobacterium* y *Bacteroides*, y un aumento de bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Barrett et al., 2013; Jacquot et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Penders et al., 2006). Finalmente, conviene señalar que los microorganismos cuya prevalencia es típicamente elevada tanto en el intestino del prematuro como en el ambiente hospitalario (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. agalactiae*, estreptococos del grupo *viridans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* y otras levaduras) pueden originar consorcios polimicrobianos complejos (Mai et al., 2011; Moles et al., 2013; Normann et al., 2013; Schwiertz et al., 2003), con potencial para formar biopelículas y para intercambiar genes que confieren virulencia o resistencia a antibióticos (Beaussart et al., 2013; Logan et al., 2013; Macnow et al., 2013; Otto et al., 2013). Un mejor conocimiento de estas interrelaciones también facilitaría el desarrollo de nuevas herramientas para el control de las infecciones en las unidades neonatales.

Las klebsiellas poseen una gran importancia mundial como patógenos oportunistas en pacientes hospitalarios. De hecho, representan entre el 3% y el 8% de todas las infecciones bacterianas nosocomiales y son la segunda causa de infecciones nosocomiales por bacterias Gram-negativas después de *E. coli* (NNIS, 2000; Podschun y Ullmann, 1998). Por otra parte, algunos estudios han demostrado que las klebsiellas forman parte de la microbiota normal de la leche humana pudiendo actuar como una bacteria comensal, mutualista y potencialmente probiótica para el intestino del RN (Heikkilä y Saris, 2003; Jimenez et al., 2008a; Jimenez et al., 2008b; Martin et al., 2003).

X.2 OBJETIVOS

En este contexto, los objetivos de esta Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1. Determinar la diversidad bacteriológica y diversos parámetros inmunológicos en el meconio y las heces de los niños prematuros durante el tiempo que permanecen en la UCIN y, posteriormente, a los dos años de edad, empleando una combinación de técnicas dependientes e independientes de cultivo.
2. Conocer la influencia de los sistemas de alimentación enteral en la colonización intestinal de los niños prematuros durante su estancia en la UCIN.
3. Caracterizar una colección de cepas del género *Klebsiella* aisladas de un brote de sepsis neonatal en una UCIN y comparar sus propiedades con las de klebsiellas aisladas de otros orígenes. Tratar de establecer características diferenciales entre cepas potencialmente patógenas y cepas comensales.

X.3 METODOLOGÍA

En esta Tesis Doctoral se estudió la adquisición y evolución de la microbiota fecal de 26 niños prematuros nacidos con ≤ 32 semanas de gestación en la Maternidad del Hospital Universitario 12 de Octubre (Madrid). Los criterios de exclusión fueron los siguientes: (a) nacidos extramuros y trasladados posteriormente a dicho centro; (b) nacidos con malformaciones mayores o con enfermedades genéticas confirmadas o sospechadas; y (c) padres incapaces de entender la información para consentir el estudio. Se obtuvo el consentimiento informado de todos los padres de los niños que participaron en el estudio, que fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico San Carlos (10/017-E).

Las muestras que se recogieron fueron:

- (a) Heces: dado que las heces de los niños prematuros son líquidas, se recogió el pañal entero, doblado, en una bolsa estéril etiquetada y sellada que se refrigeró inmediatamente a 5 °C. En el laboratorio se empleó un molde para recoger siempre la misma superficie de la cara interna del pañal; el fragmento se pesó y el material fecal presente en el mismo se resuspendió en agua de peptona. Para descartar cualquier microorganismo que pudiera vehicular el propio pañal, se recogió un pañal no utilizado (pañal control) del mismo lote que el utilizado para recoger las heces y se introdujo en una bolsa estéril etiquetada y sellada, que se refrigeró inmediatamente a 5 °C.
- (b) Leche materna, LMD y fórmula infantil: se recogió una muestra de 3 ml tras su paso por el tubo externo del sistema de alimentación enteral.

Todas las muestras se enviaron al laboratorio en menos de 4 h conservando la cadena de frío (4-5 °C) mediante un servicio de mensajería contratado específicamente para este estudio. Las muestras se recogieron semanalmente desde el nacimiento hasta el alta hospitalaria o traslado a otro centro.

Para estudiar la diversidad bacteriana en las distintas muestras biológicas obtenidas, éstas se diluyeron decimalmente en agua de peptona y las diluciones más adecuadas se sembraron en placas de ocho medios de cultivo: *Brain Heart Infusion* (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK; un medio general para el recuento de bacterias aeróbicas totales), *MacConkey* (MCK; BioMerieux, Marcy l'Etoile, France; un medio selectivo para el aislamiento de enterobacterias), *Sabouraud Dextrose Chloramphenicol* (SDC, BioMerieux; un medio selectivo para el aislamiento de levaduras y mohos), *Columbia Nadilixic Acid Agar* (CNA, BioMerieux; un medio general para el aislamiento de bacterias con requerimientos nutricionales específicos), *Baird Parker* (BP, BioMerieux; un medio selectivo para el aislamiento de estafilococos), *Wilkins-Chalgren* (WCh, Oxoid; un medio general para el recuento total de bacterias anaerobias), *de Man, Rogosa, and Sharpe* (MRS, Oxoid; un medio selectivo para el aislamiento de bacterias lácticas) y MRS suplementado con 0,5% de cisteína (MRS-Cys; un medio selectivo para el aislamiento de bacterias lácticas más anaeróbicas y bifidobacterias). Las placas de BHI, MCK, SDC, CNA, BP y MRS se incubaron aeróbicamente a 37 °C durante 24-48 h. Paralelamente, las placas de WCh y MRS-Cys se incubaron anaeróbicamente (85% de nitrógeno, 10% de hidrógeno, 5% de dióxido de carbono) en una cabina de anaerobiosis (MINI-MACS, DW Scientific, Shipley, UK) a 37 °C durante 48-72 h.

Tras el recuento de los aislados, se aisló al menos una colonia de cada una de las morfologías (color, tamaño, forma, halos...) que se observaron en cada uno de los medios de cultivo. Estos aislados se crecieron en caldo BHI o MRS y se conservaron a -80 °C en presencia de glicerol (30%, v/v).

Posteriormente, todos los aislados seleccionados se observaron mediante microscopía óptica para determinar su morfología y tinción Gram. Adicionalmente, se determinaron sus actividades catalasa, oxidasa y coagulasa y su crecimiento en placas de *Baird Parker* (BP, BioMerieux) y *Kanamycin Aesculin Azide Agar* (KAA, Oxoid), medios de cultivo selectivos para estafilococos y enterococos, respectivamente.

Inicialmente, gran parte de los aislados que, sobre la base de las pruebas preliminares, parecían pertenecer al género *Staphylococcus* fueron identificados como *S. epidermidis*, *S. aureus* o *Staphylococcus hominis* mediante una PCR multiplex basada en la secuencia del gen *dnaJ*. Brevemente, una colonia del aislado a identificar se resuspendió en 50 µl de agua estéril desionizada. A continuación, se añadieron 50 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a la suspensión; la mezcla se centrifugó a 16.000× g durante 5 min. a 4 °C. Seguidamente, 5 µl de la fase acuosa superior se emplearon como fuente de DNA para su amplificación mediante PCR en un termociclador Icyler (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Los cebadores empleados fueron J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3'), J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3') y J-StHom (5'-TTGACCACTACCCTCACAC-3'). Las parejas J-StGen/J-StAur, J-StGen/J-StEpi y J-StGen/J-StHom dan lugar a fragmentos específicos para *S. aureus* (337 pb), *S. epidermidis* (249 pb) y *S. hominis* (589 pb), respectivamente. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94 °C durante 4 min; 30 ciclos de 94 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, y 72 °C durante 30 s; y una extensión final de 72 °C durante 5 min.

Por otra parte, la mayoría de los aislados que parecían pertenecer al género *Enterococcus* se identificaron como *E. faecalis* o *E. faecium* mediante una PCR específica de especie basada en los genes *ddl*, que codifican ligasas D-alanina:D-alanina, siguiendo el protocolo descrito por Dutka-Malen et al. (1995). Para este fin se emplearon cuatro cebadores: E1 (5'-TCAAGTACAGTTAGTCTT-3'), E2 (5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'), F1 (5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3') y F2 (5'-CATCGTGTAAGC TAACTTC-3'). El primer par (E1 y E2) detectaba específicamente *E. faecium*, mientras que el segundo (F1 y F2) es específico de *E. faecalis*. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 1 ciclo de 94°C durante 2 min; 25 ciclos de 94 °C durante 1 min, 54 °C durante 1 min, y 72 °C durante 1 min; y una extensión final de 72 °C durante 1 min.

Los productos de PCR obtenidos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa (1,5 - 2%) a 90 V durante 45 min., empleando un marcador de tamaño de 1 kb (Bioline) y tinción con Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium), en un sistema de visualización de geles Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

La identificación del resto de los aislados se realizó mediante la secuenciación por PCR de un fragmento (470 pb) del gen 16S rDNA, utilizando los cebadores y condiciones descritas por Kullen et al. (2000). Los amplicones resultantes se purificaron empleando el *kit* Nucleospin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren,

Germany) y se secuenciaron en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid (Parque Científico de Madrid). Las secuencias obtenidas se compararon con las existentes en la base de datos EMBL empleando el algoritmo BLAST y la identidad de los aislados se estableció en base a identidades de secuencia superiores al 98%.

Los aislados pertenecientes a una misma especie y muestra se tipificaron mediante la técnica RAPD. El DNA se extrajo de una colonia de cada aislado siguiendo el protocolo previamente descrito y se empleó como molde para determinar su perfil de RAPD empleando el cebador OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') (Ruiz-Barba et al., 2005). Tras las amplificaciones, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2% y los geles se visualizaron en el sistema Gel Doc 2000. El análisis de los perfiles obtenidos se realizó con el *software* InfoQuest FP (Bio-Rad) utilizando el método UPGMA basado en el coeficiente de similitud de Dice. Esta técnica permitió elegir un representante de cada perfil para futuros estudios, además de observar la transferencia madre-hijo de ciertas cepas bacterianas.

Con el objetivo de estudiar la microbiota presente en las muestras de meconio y heces se utilizó una técnica independiente de cultivo, la micromatriz (*microarray*) de DNA *Human Intestinal Tract Chip* (HITChip, Unidad de Microbiología, Universidad de Wageningen, Holanda). Para ello, se realizó la extracción del DNA total de las muestras a investigar. En primer lugar se pesaron 0,1 g de meconio o heces y se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de extracción (Tris-HCl 200 pH 7,5, SDS al 0,5 %, EDTA 25 mM, NaCl 250 mM, 20 mg/ml de lisozima, 5 mg/ml de lisostafina) y 0,3 ml de acetato de sodio 3 M. Después, se realizó una lisis mecánica con perlas de zirconia/sílice de 0,1 mm de diámetro (Sigma, St. Louis, USA) usando un homogeneizador FastPrep (Qbiogene, Irvine, CA, EE.UU.) a una velocidad de 6 m/s durante 30 s. La solución de lisis se trató con 0,1 mg/ml de proteinasa K (Sigma), y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente, se añadió 0,1 ml de NaCl 1,5 M y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Tras lo cual, se centrifugó la mezcla a 16.000 ×g para sedimentar los restos celulares insolubles. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo y se lavó dos veces con el mismo volumen de fenol/cloroformo/isoamilalcohol (25:24:1) (Sigma). El DNA se precipitó con la adición de 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 1 h. El DNA precipitado, se lavó con etanol al 70 %, se dejó secar al aire, y finalmente, se resuspendió en tampón TE. La concentración y calidad del DNA obtenido se determinaron con el espectrofotómetro UV NanoDrop® ND-1000 (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, EEUU).

La micromatriz de DNA HITChip se compone de más de 4.800 sondas de oligonucleótidos dirigidos a las regiones hipervariables V1 y V6 del gen 16S rRNA de 1.132 filotipos, organizadas por duplicado en una matriz de 8×15K elaborada *ad hoc* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). Las sondas están repartidas sobre la matriz en tres niveles de filogenia en función de sus secuencias de 16S rRNA, como se ha descrito anteriormente (Rajilic-Stojanovic et al., 2009). La intensidad de la señal HITChip se analizó mediante los niveles filogenéticos siguientes: 1) el nivel de filo, con la especificación de *Firmicutes* a grupos *Clostridium* y otras clases creando, en conjunto, 23 grupos, 2) el nivel de los similares a género, incluidos 131 grupos de secuencias con más de un 90 % de homología, y 3) el nivel de los filotipos (o similares a especie) con 1.038 filotipos distintos incluyendo una similitud del >98% de secuencia a especies cultivables o clones correspondientes a microorganismos no

cultivables. Aquellos taxones a nivel de género con $\geq 90\%$ de secuencia idéntica con múltiples géneros se denominan "*et rel.*".

Todos los pasos necesarios para la realización del análisis con la micromatriz de DNA HITChip, incluyendo la amplificación por PCR de los genes del 16S rRNA, la producción y el marcado del RNA, la hibridación y la extracción de datos, se llevaron a cabo básicamente como describen Rajilic-Stojanovic et al. (2009). Los datos fueron extraídos de las imágenes de las micromatrices de DNA utilizando el software de Agilent, versión 9.1 (<http://www.Agilent.com>), posteriormente normalizados, y analizados mediante un conjunto de comandos para R (<http://r-project.org>) en combinación con una base de datos hecha a medida que se ejecuta bajo el sistema de gestión de base de datos MySQL (<http://www.mysql.com>; Rajilic-Stojanovic et al., 2009). La agrupación jerárquica de los perfiles de las sondas se llevó a cabo utilizando la distancia de Pearson y el método de mínima varianza de Ward.

Paralelamente se analizó la concentración de 18 citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento en muestras de meconio y heces mediante el uso de *kits* comerciales de las citoquinas humanas del grupo I y II (Bio-Rad) entre las que se encuentran las IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, y IL-17, el interferón-gamma (IFN- γ), G-CSF, el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), el factor de crecimiento regulado por el oncogén alfa (Gro- α), MCP-1, MIP-1 β y TNF- α , en el sistema de Bioplex 200 (Bio-Rad). Al mismo tiempo, se determinó la concentración de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM e IgA en el mismo equipo utilizando el kit comercial de isotipos humanos BioPlex Pro (Bio-Rad).

En el transcurso de esta Tesis Doctoral, se aislaron y caracterizaron un total de 57 aislados de *Klebsiella* spp. Todos ellos se identificaron mediante la secuenciación de un fragmento de 454 pb del gen *rpoB*. Las secuencias obtenidas se alinearon utilizando el método Clustal W (Thompson et al., 1994) con el *software* MEGA5 (versión 5.2.1) (Tamura et al., 2007) y, seguidamente, se construyeron árboles filogenéticos basados en el método del vecino más cercano con el modelo paramétrico de Jukes-Cantor (Saitou y Nei, 1987). La presencia de los genes *magA*, *rmpA*, *wabG*, *uge*, *kfu* y *fimH* que codifican algunos factores de virulencia de *K. pneumoniae* se determinaron mediante PCR.

Adicionalmente, para determinar el perfil plasmídico, los plásmidos de pequeño tamaño se extrajeron con el kit comercial QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Alemania) y los de mayor tamaño (>16 kb) realizando una digestión con la nucleasa PFGE-S1 (Takara Bio Inc, Shiga, Japón).

Por otra parte, se empleó la técnica de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para el genotipado de los aislados identificados como *Klebsiella* spp. siguiendo el procedimiento descrito por Kaufmann et al. (1998).

Finalmente, la sensibilidad de las cepas a distintos antibióticos se realizó calculando las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante un método de microdilución utilizando placas *Sensititre* EMIZA 9EF (TREK Diagnostic Systems, Cleveland EEUU). La posible producción de β -Lactamasas de Espectro Extendido (BLEEs) se evaluó mediante la prueba de sinergia de doble disco (Jarlier et al., 1988), mientras que la presencia de los genes que codifican la biosíntesis de la BLEE CTX-M (*bla_{CTX-M}*) se realizó mediante PCR.

En el análisis estadístico, los datos cuantitativos se expresaron como la media y el intervalo de confianza del 95% (IC) de la media o, cuando la distribución no era normal, como la mediana y el rango intercuartil (IQR). La riqueza y diversidad de la microbiota presente en las muestras de meconio y heces se determinaron mediante el cálculo del índice de diversidad de Shannon-Weaver, que tiene en cuenta el número y la frecuencia de aparición de las diversas especies bacterianas. Para comparar proporciones se realizaron tablas de contingencia empleando la prueba exacta de Fisher y la prueba de probabilidad de Freeman-Halton. Los análisis no paramétricos de comparaciones de medidas repetidas de Friedman y *t*-tests para las muestras pareadas se aplicaron para determinar las diferencias entre los recuentos bacterianos de cada grupo microbiano identificado o las intensidades de señal de hibridación de los grupos bacterianos a través del tiempo. El análisis de los componentes principales (PCA) se aplicó al conjunto de datos reuniendo el perfil microbiológico de todas las muestras. El mismo análisis se realizó para los componentes inmunológicos. Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0,05$. Para llevar a cabo los análisis descritos, se utilizaron los programas informáticos Statgraphics Centurion XVI versión 1.16.15 (StatPoint Technologies Inc.) y R 2.13.2 (R project, Statistical Software).

X.4 RESULTADOS

A lo largo de esta Tesis Doctoral, se recogieron 17 muestras de meconio y 128 de heces durante la estancia hospitalaria de los niños (media: 6,4 muestras por niño) y su diversidad bacteriana se analizó mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo. Las técnicas dependientes de cultivo permiten el aislamiento, cuantificación y caracterización de las bacterias cultivables mientras que las técnicas moleculares proporcionan información más detallada sobre la diversidad bacteriana de una muestra. Paralelamente, se recogieron 135 muestras del alimento que recibieron estos mismos niños (leche de su propia madre, n=85; LMD, n=35; fórmula infantil, n=15), después de su paso a través del tubo externo del sistema de alimentación enteral. En este caso, su composición microbiológica se evaluó únicamente mediante técnicas de cultivo. En total, se identificaron aproximadamente 4.000 aislados al nivel de especie.

Globalmente, los resultados obtenidos mediante las técnicas de cultivo, por una parte, y la micromatriz de DNA HITChip, por otra, fueron muy similares aunque las primeras mostraron una menor sensibilidad. En general, se observó una gran variabilidad interindividual aunque los perfiles del microbioma del meconio fueron diferentes de los observados en las muestras de heces. Las técnicas dependientes de cultivo revelaron que *Staphylococcus* era el género predominante en meconio mientras que en las heces dominaron los enterococos junto con ciertas bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, *Escherichia fergusonii*, *K. pneumoniae* y *S. marcescens*. En los ensayos realizados con el HITChip, los principales grupos bacterianos detectados fueron *Bacillus* y otros *Firmicutes* en el meconio y *Proteobacteria* en las muestras de heces. Además, los resultados obtenidos con esta micromatriz mostraron una mayor abundancia de secuencias relacionadas con las especies *Lactobacillus plantarum* y *Streptococcus mitis* en meconio mientras que aquellas asociadas con *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Yersinia* spp. hicieron lo propio en las de heces. La diversidad de las comunidades microbianas, evaluada mediante el índice de Shannon-Weaver, fue menor en las muestras de meconio (0,42) que en las de heces (1,19-1,35).

En general, se pudo observar el mismo perfil bacteriano en las muestras de leche de la propia madre, LMD y fórmula tras su paso por el tubo externo del sistema de alimentación enteral. *Staphylococcus* fue el género más frecuentemente aislado de muestras de leche de la propia madre (93%), a diferencia de las muestras de leche donada y fórmula donde estaba presente en un 37% y un 11% de las muestras, respectivamente. *Enterococcus* fue el género más frecuente en las muestras de LMD y fórmula (49% y 27%, respectivamente) pero también se aisló en un alto porcentaje (61%) de las muestras de leche de la propia madre. Algunas bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Serratia* spp., también se aislaron a partir de los tres tipos de alimentación. Por el contrario, sólo se pudieron detectar bifidobacterias en dos muestras de leche de la propia madre. Los recuentos bacterianos totales de *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Serratia* fueron significativamente mayores en las muestras de leche de la propia madre (5,03, 4,82 y 5,58 log₁₀ UFC/ml, respectivamente) que en las de LMD o fórmula. Las especies dominantes, tanto en muestras fecales como de leche, fueron *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* y *E. coli*. La aplicación de la técnica de microscopía electrónica de barrido permitió observar la presencia de una densa

biopelícula bacteriana, compuesta básicamente de las especies bacterianas citadas anteriormente, en varias partes de los sistemas de alimentación enteral.

Mediante el test de Fisher se evaluaron las posibles asociaciones entre los parámetros demográficos y clínicos y el aislamiento de los diferentes géneros. La presencia del género *Serratia* parecía estar fuertemente influenciado por las variables demográficas o clínicas relacionadas con la prematuridad, mientras que la presencia de *E. coli* fue mayor en las muestras de heces procedentes de los niños con mayor EG.

Posteriormente, el análisis de las heces de los mismos niños cuando cumplieron dos años de edad reveló que los géneros relacionados con el ambiente hospitalario (*E. coli*, *Klebsiella* spp. o *Serratia* spp.) que habían caracterizado las heces de los niños durante su estancia en la UCIN se habían reemplazado por bacterias de los grupos IV y XIVa del género *Clostridium*. Estos últimos microorganismos son dominantes en la microbiota fecal de los adultos sanos, característica de un ambiente con un bajo potencial redox y una concentración relativamente elevada de ácidos grasos de cadena corta.

Con relación a los factores inmunológicos estudiados, los valores obtenidos mostraron una elevada variabilidad interindividual, que se reflejaba tanto en las frecuencias de detección como en las concentraciones de las diversas citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento e inmunoglobulinas analizadas. Las concentraciones de todos los componentes fueron menores en las muestras de meconio que en las de heces, con excepción de MIP-1 β , GM-CSF e IgA.

Finalmente, el análisis filogenético de una secuencia parcial del gen *rpoB* resultó muy útil para la identificación de aquellos aislados pertenecientes a las especies *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola* y *Raoultella planticola*. El genotipado de los aislados por PFGE reveló una alta diversidad genética. No se encontraron diferencias con respecto a la presencia de los genes *magA*, *rpmA*, *wabG*, *uge*, *kfu* y *fimH*, que codifican distintos factores de virulencia en *K. pneumoniae*, ni tampoco en la de aquellos que codifican los sideróforos enterobactina, aerobactina y yersibactina. Sin embargo, las cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. variicola* que se aislaron de un brote nosocomial mostraron resistencia a un amplio espectro de antibióticos clínicamente relevantes y producción de BLEEs. El análisis de los perfiles de PFGE de los productores de BLEEs que se aislaron del Servicio de Neonatología en un plazo de seis meses reveló la existencia de un brote policlonal. Los aislados de *K. pneumoniae* y *K. variicola* productores de la BLEE CTX-M-15 portaban un plásmido de 75 kb. Además, se detectaron dos cepas de *K. pneumoniae* que producían bacteriocinas con actividad antimicrobiana frente a cepas de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* y *K. variicola*, incluyendo las causantes del brote nosocomial.

X.5 DISCUSIÓN

El proceso de adquisición y evolución de la microbiota intestinal infantil depende de diversos factores, como la EG, el tipo de parto, la dieta o los tratamientos médicos, y tiene importantes consecuencias para la salud humana (Blaut y Clavel, 2007; Murgas et al., 2011). El estudio de la sucesión de especies bacterianas en las muestras de meconio y heces obtenidas en las tres primeras semanas de vida de RN prematuros mostró una alta correlación entre los resultados obtenidos con las técnicas dependientes e independientes de cultivo. Además, la combinación de ambos tipos de técnicas permitió abordar el problema desde puntos de vista complementarios. Globalmente, los perfiles microbiológicos tuvieron una gran variabilidad individual. Además, la microbiota del meconio era menos diversa y mostraba notables diferencias cuando se comparaba con la existente en las muestras de heces, en consonancia con lo observado por otros autores (Magne et al., 2006).

El nacimiento prematuro generalmente retrasa la colonización intestinal y determina un patrón de colonización anómalo o aberrante en comparación con el que se observa en niños sanos nacidos a término (Koenig et al., 2011). Esto parece afectar a la salud del recién nacido y constituye un factor de riesgo para el desarrollo de infecciones gastrointestinales como por ejemplo la enterocolitis necrotizante (Claud and Walker, 2001). En un estudio reciente, los RN prematuros que desarrollaron sepsis se caracterizaban por tener un predominio de *Proteobacteria* y *Firmicutes* en su microbiota intestinal mientras que en los sujetos más sanos aumentaba la abundancia relativa de microorganismos aerobios de modo semejante a lo que se aprecia en las comunidades microbianas (*Clostridium*, *Klebsiella* y *Veillonella*) de individuos más maduros (Madan et al., 2012).

La microbiota fecal de RN prematuros generalmente está dominada por las mismas bacterias cultivables que caracterizan los ambientes hospitalarios (por ejemplo, las UCIN), en los que los antibióticos se utilizan profusamente. En esta Tesis, la presencia de *Serratia* estaba asociada a distintas variables relacionadas con el ambiente y las prácticas hospitalarias, entre las que se incluían la antibioterapia y el uso de ventilación mecánica. El temor a las infecciones en la UCIN propicia el empleo de antibióticos de amplio espectro, una estrategia que reduce la diversidad bacteriana y aumenta el riesgo de colonización con cepas bacterianas resistentes a los antibióticos.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral indican que el meconio expulsado de forma natural por los RN prematuros alberga una microbiota específica que difiere de la que se observa en las muestras de heces obtenidas al cabo de unos días de vida. Probablemente, dichas bacterias podrían llegar al intestino del feto a través del líquido amniótico que ingieren mientras están en el útero materno. Otros autores han descrito que las bacterias del tracto digestivo pueden llegar hasta el fluido amniótico a través del torrente sanguíneo e influir en la evolución final del embarazo (Dasanayake et al., 2005; Kornman y Loesche, 1980). Los estreptococos y los estafilococos son las bacterias predominantes en las muestras de meconio y, curiosamente, se ha descrito su presencia en muestras de corioamnion de mujeres sanas a las que se había practicado una cesárea (Bearfield et al., 2002; Jimenez et al., 2005). La posibilidad de que la colonización intestinal del RN se inicie durante la etapa fetal debería ser objeto de más estudios por sus importantes implicaciones para la

salud del niño; por ejemplo, su modulación durante el embarazo podría contribuir a evitar nacimientos prematuros.

Hasta la fecha, muy pocos estudios han considerado el papel de las sondas nasogástricas utilizadas para la alimentación enteral del RN como posible sitio de colonización bacteriana y, por ende, como una fuente de bacterias para el RN prematuro. La presencia de estafilococos (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococos (*E. faecalis*, *E. faecium*) y enterobacterias (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*...), entre los que se incluyen clones portadores de genes de resistencia a antibióticos, en la pared interna de la mayoría de las sondas nasogástricas analizadas hasta el momento ya había sido descrita en varios estudios (Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b; Hurrell et al., 2009). En esta Tesis Doctoral se pudieron detectar esos mismos microorganismos, y otros estrechamente relacionados con ellos, tanto en las tubuladuras que conectan con la sonda nasogástrica como en todas las muestras de leche (de la propia madre, donada y de fórmula) recogidas tras su paso por la tubuladura.

La principal diferencia bacteriológica entre la leche de la propia madre y los otros dos tipos de alimentación fue la frecuencia con la que se aislaron estafilococos (principalmente *S. epidermidis*) y su concentración, que fueron notablemente superiores en el caso de las muestras de leche proporcionadas por la propia madre. Los estafilococos son, al menos cuantitativamente, el grupo bacteriano más importante que se encuentra en el microbioma de la leche materna (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Ward et al., 2013). Anteriormente se había demostrado que *S. epidermidis* era la especie con mayor prevalencia tanto en la leche materna como en las heces de los niños amamantados. Sin embargo, esta especie estaba prácticamente ausente en aquellas muestras procedentes de niños alimentados con fórmulas infantiles (Jimenez et al., 2008). Curiosamente, los estafilococos parecen ser las bacterias que tienen la mayor habilidad para utilizar los oligosacáridos de la leche materna (Hunt et al., 2012).

A pesar de las diferencias encontradas en cuanto a la diversidad y abundancia de bacterias, los tres tipos de alimentos administrados a los RN prematuros mostraron un perfil bacteriano común. Este hecho podría reflejar la contaminación entérica de los conectores a partir de las sondas nasogástricas y, también, el hecho de que queden restos de bacterias en la leche no sometida a tratamiento térmico, puesto que se puede alimentar al niño a través de la misma tubuladura utilizando para ello distintos tipos de leche. Por lo tanto, la práctica de mantener las sondas nasogástricas, las tubuladuras que conectan con ellas o los conectores en los neonatos durante largos periodos de tiempo debería ser reconsiderada.

El análisis por microscopía electrónica de barrido de las superficies internas de algunas muestras de tubuladuras, conectores y sondas nasogástricas utilizados para la alimentación de los RN prematuros reveló que se forman complejas comunidades bacterianas cuando esos dispositivos están colocados durante, al menos, más de 12 h. Debe tenerse en cuenta que la porción interna de la sonda nasogástrica se mantiene a 37 °C y que pueden estar introducidas en el niño durante más de 48 h; de esta forma, actúan como un lugar en el que los patógenos oportunistas que proceden del tracto gastrointestinal del hospedador pueden proliferar (Hurrell et al., 2009). A medida que estas biopelículas envejecen, las bacterias se desprenden en forma de agregados que, posteriormente, inocularán cualquier alimento que pase por la tubuladura fomentando la multiplicación bacteriana y la reinoculación del intestino del prematuro con la

misma microbiota asociada al ambiente hospitalario. Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral sugieren que podría haber una relación directa entre las especies bacterianas asociadas al ambiente hospitalario que forman las gruesas biopelículas en las tubuladuras empleadas para la alimentación del niño y su presencia, en altas concentraciones, en las heces de los RN prematuros.

La correcta identificación de los aislados de *Klebsiella* spp. es muy importante desde un punto de vista epidemiológico y clínico pero no es posible utilizando métodos moleculares tradicionales, como por ejemplo la secuenciación del gen 16S rDNA, debido a las escasas diferencias que se encuentran en la secuencia nucleotídica de dicho gen. En esta Tesis Doctoral, la amplificación y secuenciación parcial de un fragmento de 454 pb del gen *rpoB* permitió una adecuada identificación de los aislados de *Klebsiella* spp., tal y como se había descrito anteriormente (Drancourt et al., 2001). La escasa diversidad genética observada entre las cepas aisladas de un brote de sepsis en una UCIN sugiere una diseminación clonal.

Globalmente, todas las especies de *Klebsiella* analizadas fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos ensayados en esta Tesis Doctoral. La única excepción fueron la mayoría de las cepas de *K. pneumoniae* aisladas durante la aparición de un brote hospitalario en una UCIN, que fueron productoras de BLEEs de la familia CTX-M. Este hecho concuerda con la existencia de un brote nosocomial ya que las cepas de *K. pneumoniae* productoras de BLEEs pueden provocar brotes en UCIN (Mantilla et al., 2006; Kristof et al., 2007). Además, algunas cepas mostraron resistencia a los carbapenems, en concordancia con otros estudios en los que se ha descrito la fuerte dispersión de cepas con enzimas capaces de hidrolizar los carbapenems, combinadas o no con BLEEs (Nordmann et al., 2009).

Una posible estrategia para modular el proceso de establecimiento de la microbiota en los neonatos prematuros es la aplicación, incluso durante el embarazo, de probióticos específicamente seleccionados para dicha población. El número de estudios realizados sobre los efectos de los probióticos en los RN prematuros ha aumentando considerablemente en los últimos años y, en todos los casos, se ha demostrado su seguridad. Por otra parte, todos los meta-análisis publicados indican que los probióticos tienen un impacto positivo sobre diversos parámetros clínicos, entre los que destaca una disminución significativa de la incidencia de enterocolitis necrotizante y de la mortalidad debida a cualquier causa (AlFaleh et al., 2011; Janvier et al., 2014). Una alternativa muy prometedora para la aplicación de probióticos es el desarrollo de comunidades microbianas sintéticas que sean específicas para un nicho concreto. Estas microbiotas sintéticas consisten en mezclas complejas de cepas viables que asemejen, por ejemplo, la microbiota natural de la leche materna o la de las heces de lactantes sanos. Indudablemente, este enfoque tiene un gran atractivo para la prevención y el tratamiento de infecciones en la población de RN prematuros, en el contexto de la creciente aparición de bacterias patógenas multirresistentes.

X.6 CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

Primera. La microbiota fecal de los niños prematuros posee un marcado carácter individual y muestra fluctuaciones durante las primeras semanas de vida. En general, la microbiota fecal de estos niños está dominada por bacterias de los géneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Klebsiella* y *Escherichia*. Por otro lado, la colonización con lactobacilos y bifidobacterias parece ser muy baja durante el periodo de hospitalización.

Segunda. Globalmente, estos hechos pueden reflejar la estancia prolongada de los niños en unidades neonatales caracterizadas por una elevada prevalencia de microorganismos propios del ambiente hospitalario, como son los pertenecientes a los géneros citados anteriormente. Las sondas de alimentación enteral pueden ser una fuente de bacterias para la colonización del tracto gastrointestinal de los recién nacidos prematuros.

Tercera. La diversidad de la microbiota fecal de los niños que nacieron prematuramente aumenta cuando cumplen dos años equiparándose a los valores descritos a esa misma edad para los niños que nacieron a término. Globalmente, se observa una sustitución de algunas de las bacterias asociadas al ambiente hospitalario por otras que son características de la microbiota de los adultos sanos.

Cuarta. La secuenciación del gen *rpoB* es una herramienta útil para la identificación a nivel de especie de los aislados pertenecientes al género *Klebsiella*. Las pruebas fenotípicas y genotípicas disponibles en la actualidad no permiten diferenciar claramente las cepas comensales de las potencialmente patógenas. No obstante, la multirresistencia a antibióticos clínicamente relevantes puede explicar el fracaso terapéutico en hospedadores que, como sucede en el caso de los niños prematuros, son especialmente sensibles a las infecciones.

X.7 BIBLIOGRAFÍA

- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K. F., et al. (2009). Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(1), 112-125.
- American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), e827-41.
- AlFaleh, K., Anabrees, J., Bassler, D. & Al-Kharfi, T. (2011). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), CD008991.
- Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., et al. (2013). Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), 535-542.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- Ballard, O. & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
- Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O'Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., et al. (2013). The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(4), F334-40.
- Bearfield, C., Davenport, E. S., Sivapathasundaram, V. & Allaker, R. P. (2002). Possible association between amniotic fluid microorganism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(5), 527-533.
- Beaussart, A., Herman, P., El-Kirat-Chatel, S., Lipke, P. N., Kucharikova, S., Van Dijck, P., et al. (2013). Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale*, 5(22), 10894-10900.
- Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A. P., Merialdi, M., Requejo, J. H., et al. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: A systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(1), 31-38.
- Blaut, M. & Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*, 137(Suppl 2), 751S-755S.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A., Narwal, R., et al. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *The Lancet*, 379(9832), 2162-2172.
- Blencowe, H., Lawn, J. E., Vazquez, T., Fielder, A. & Gilbert, C. (2013). Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatric Research*, 74(S1), 35-49.
- Buddington, R. K., Williams, C. H., Kostek, B. M., Buddington, K. K. & Kullen, M. J. (2010). Maternal-to-infant transmission of probiotics: Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97(3), 250-256.

- Bustos, G. (2008). Alimentación enteral del recién nacido pretérmino. *Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos De La AEP: Neonatología. Asociación Española De Pediatría Y Sociedad Española De Neonatología. Madrid: AEP*, 58-67.
- Chang, J. Y., Shin, S. M., Chun, J., Lee, J. H. & Seo, J. K. (2011). Pyrosequencing-based molecular monitoring of the intestinal bacterial colonization in preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 512-519.
- Ciliborg, M. S., Boye, M. & Sangild, P. T. (2012). Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Human Development*, 88, S41-S49.
- Claud, E. C. & Walker, W. A. (2001). Hypothesis: Inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(8), 1398-1403.
- Dasanayake, A. P., Li, Y., Wiener, H., Ruby, J. D. & Lee, M. J. (2005). Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of Periodontology*, 76(2), 171-177.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925-932.
- Dutka-Malen, S., Evers, S. & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 24-27.
- Eidelman, A. I. (2012). Breastfeeding and the use of human milk: An analysis of the American Academy of Pediatrics, breastfeeding policy statement. *Breastfeeding Medicine*, 7(5), 323-324.
- Espinosa-Martos, I., Moles, L., Manzano, S., Fernández, L., Montilla, A., Corzo, N., et al. (2014). Bacteriological, biochemical and immunological properties of colostrum and milk from mothers of extremely preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, in press.
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., de Segura, A. G., Escuder, D., Bustos, G., Pallas, C., et al. (2013). Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 560-568.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., et al. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 1-10.
- García-Lara, N., García-Algar, O. & Alonso, C. R. P. (2012). Sobre bancos de leche humana y lactancia materna. *Anales De Pediatría: Publicación Oficial De La Asociación Española De Pediatría (AEP)*, 76(5), 247-249.
- Heikkilä, M. P. & Saris, P. E. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 471-478.
- Henderson, A. (2005). Vitamin D and the breastfed infant. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 34(3), 367-372.
- Hooper, L. V. & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships

- in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schutte, U. M., Beck, D. L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One*, 6(6), e21313.
- Hunt, K. M., Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C. A., Williams, J. E., Shafii, B., et al. (2012). Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4763-4770.
- Hurrell, E., Kucerova, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Hilton, A., Armstrong, R., et al. (2009). Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the enterobacteriaceae. *BMC Infectious Diseases*, 9, 146-2334-9-146.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., et al. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *The Journal of Pediatrics*, 158(3), 390-396.
- Janvier, A., Malo, J. & Barrington, K. J. (2014). Cohort study of probiotics in a North American neonatal intensive care unit. *The Journal of Pediatrics* 164(5), 980-985.
- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G. & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.
- Jimenez, E., Delgado, S., Fernandez, L., Garcia, N., Albujar, M., Gomez, A., et al. (2008a). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*, 159(9-10), 595-601.
- Jimenez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albujar, M., Garcia, N., et al. (2008b). *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*, 8, 143.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253-1262.
- Kaufmann, M. E. (1998). Pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular bacteriology* (pp. 33-50), Springer.
- Klingenberg, C., Embleton, N. D., Jacobs, S. E., O'Connell, L. A. & Kuschel, C. A. (2012). Enteral feeding practices in very preterm infants: An international survey. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 97(1), F56-61.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (Suppl 1), 4578-4585.
- Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980). The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of Periodontal Research*, 15(2), 111-122.
- Kristóf, K., Szabó, D., Marsh, J., Cser, V., Janik, L., Rozgonyi, F., et al. (2007). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal

- intensive care unit: Risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(8), 563-570.
- Kullen, M., Sanozky-Dawes, R., Crowell, D. & Klaenhammer, T. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 511-516.
- LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., et al. (2011). Beyond bacteria: A study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PloS One*, 6(12), e27858.
- Lee da, E., Park, S. Y., Choi, J. S., Kim, S. Y., Lim, J. H., Yang, J. H., et al. (2012). Early second trimester maternal plasma levels of thrombin-inhibitor complexes and subsequent spontaneous preterm delivery. *Prenatal Diagnosis*, 32(12), 1170-1173.
- Logan, L. K., Healy, S. A., Kabat, W. J., Liu, G., Sullivan, C. L., Peaceman, A. M., et al. (2013). A prospective cohort pilot study of the clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pregnant women at the time of group B streptococcal screening in a large urban medical center in Chicago, IL, USA. *Virulence*, 4(7), 654-658.
- Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), 1035S-1045S.
- Macnow, T., O'Toole, D., DeLaMora, P., Murray, M., Rivera, K., Whittier, S., et al. (2013). Utility of surveillance cultures for antimicrobial resistant organisms in infants transferred to the neonatal intensive care unit. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(12), E443-E450.
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H., et al. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 97(6), F456-F462.
- Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P. & Suaud, A. (2006). Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(1), 128-138.
- Mai, V., Young, C. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Casella, G., et al. (2011). Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloS One*, 6(6), e20647.
- Mantilla, J.R., Reguero, M.T., González, E.B., García, I.A., Leal, A.L., Espinal, P.A., et al. (2006). Molecular characterization of an outbreak caused by CTX-M-12 producing *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital's neonatal intensive care unit. *Biomedica*, 26, 408-414.
- Martin, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H. & Rodriguez, J. M. (2007). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2638-2644.
- Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., Marin, M. L., Zoetendal, E. G., et al. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR.

- Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 965-969.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiminez, E., Marin, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martino, D. J., Currie, H., Taylor, A., Conway, P. & Prescott, S. L. (2008). Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(1), 69-78.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Gilliam, C. H., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002a). Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(7), 1011-1012.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Saltzman, D. A., Wallett, T., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002b). Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(8), 1177-1182.
- Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., et al. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 8(6), e66986.
- Murgas Torrazza, R. & Neu, J. (2011). The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 31 (Suppl 1), S29-34.
- NNIS. (2000). National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-april 2000, issued June 2000. *American Journal of Infection Control*, 28(6), 429-448.
- Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 9, 228-236.
- Normann, E., Fahlen, A., Engstrand, L. & Lilja, H. E. (2013). Intestinal microbial profiles in extremely preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatrica*, 102(2), 129-136.
- OMS. (1977). WHO: Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths modifications recommended by FIGO as amended october 14, 1976. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 56(3), 247-253.
- OMS. (2012). Born too soon: The global action report on preterm birth.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1524-1532.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.

- Premji, S. S. & Chessell, L. (2011). Continuous nasogastric milk feeding versus intermittent bolus milk feeding for premature infants less than 1500 grams. *Cochrane Database Syst Rev*, 11.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kijander, K., Surakka, A., Smidt, H., et al. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: Analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1736-1751.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A. & Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 333-335.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Schanler, R. J. (2011). Outcomes of human milk-fed premature infants. *Seminars in Perinatology*, 35 (1), 29-33.
- Schanler, R. J. (2007). Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 625S-628S.
- Schumann, A., Nutton, S., Donnicola, D., Comelli, E. M., Mansourian, R., Cherbut, C., et al. (2005). Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiological Genomics*, 23(2), 235-245.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Lobnitz, M., Michel, P., Radke, M. & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research*, 54(3), 393-399.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599.
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., et al. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *Immunology and Medical Microbiology*, 56(1), 80-87.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I. & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: A functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, 13(1), 116.
- Westerbeek, E. A. M., van den Berg, A., Lafeber, H. N., Knol, J., Fetter, W. P. F. & van Elburg, R. M. (2006). The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clinical Nutrition*, 25(3), 361-368.
- Wight, N., Morton, J. & Kim, J. (2008). Managing breastfeeding in the NICU. *Best Medicine: Human Milk in the NICU*, 111-135.
- Xu, J. & Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12), 12218-12221.

- States of America*, 100(18), 10452-10459.
- Yatsunenko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227.

XI. EXTENDED ABSTRACT²

²This extended abstract is included in fulfilment of the directives of the regulation of development of the Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, which regulates the studies of doctorate at the Universidad Complutense de Madrid (UCM) (BOUC nº14, de 21 de diciembre de 2012) and in agreement with the specifications established by the Commission of Doctorate of the UCM.

XI.1 INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) defines preterm infants as those that are born at a gestational age of ≤ 37 weeks. There are different classifications of preterm infants according to their gestational age and weight, two key parameters that determine the prognosis and appropriate medical care (WHO, 1977). Preterm infants are very immature compared with full term infants and, as a consequence, they need additional support to survive outside the maternal uterus. As a consequence, they usually are admitted in the neonatal intensive care unit (NICU). Globally, the rate of preterm birth rate represents about 10% of babies born each year (WHO, 2012). A relatively high number of preterm infants die shortly after they are born and, among the survivors, a high proportion requires special care and/or will endure life sequelae with a huge emotional and economic burden (Blencowe et al., 2012b).

Several factors are associated with a higher risk of preterm birth, although the actual cause for most preterm births remains unknown. Identifying the risk factors for preterm birth before conception or early in pregnancy may help to prevent this complication. After birth, preterm infants can experience diverse complications both in the short, medium, and long term, which may have different prognosis and evolution depending on where they are born (Blencowe et al., 2013).

In our environment, the management of preterm infants has improved markedly over the last few decades due to scientific and technological advances. In fact, a notable reduction in mortality and morbidity of preterm babies, even in extremely preterm ones (< 26 weeks), has been achieved in developed countries (Beck et al., 2010). One of the most relevant aspects of the management of these preterm babies is their nutrition in order to achieve a suitable postnatal growth rate. Thus, the objective of several early nutritional interventions (early parenteral nutrition, trophic enteral nutrition, fortification) is to prevent undernutrition and reduce the number of individuals with body weight, length and head circumference below the expected values for his corrected age (Klingenberg et al., 2012). Minimal enteral nutrition attempts to promote structural, functional and microbial maturation of the immature intestine by the administration of small amounts of milk in addition to parenteral nutrition (Cilieborg et al., 2012).

Nowadays, there is strong evidence that breast milk (fortified when required) is the best choice for infants at any gestational age, including the preterm ones. In fact, the anti-infectious, immunological, neurological, emotional and economic benefits of breast milk are particularly relevant in this particular population (Agostoni et al., 2009; Eidelman, 2012; Lee et al., 2012; Schanler, 2011; Schanler, 2007; Wight et al., 2008). These effects are most likely due to the combined action of the nutrients and a variety of bioactive factors present in colostrum and breast milk, such as immunoglobulins (Ig), immunocompetent cells, antimicrobial fatty acids, polyamines, oligosaccharides, lysozyme, lactoferrin and other glycoproteins, antimicrobial peptides and commensal and potentially probiotic bacteria (Ballard and Morrow, 2013; Fernandez et al., 2013). Recently it has been shown that colostrum of very low weight preterm's mothers contains higher concentrations of various immunological compounds (including IgA, interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α), IL-4, IL-17, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β),

IL-5, IL-7 or granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) than colostrum from full term infant's mothers (Espinosa-Martos et al., 2014).

When own mother's milk (OMM) is not available, for any reason, donor milk (DM) becomes the best alternative (American Academy of Pediatrics, 2012; Arslanoğlu et al, 2013). Due to all proved and potential benefits of DM, it seems that it is the time to foster the use of DM as the standard nutrition for high risk preterm infants when OMM is not available (García-Lara et al., 2012). Most of the biological samples analyzed in this Thesis were obtained from the Neonatology Service of Hospital 12 de Octubre in Madrid and its Milk Bank, the first one that was opened in Spain with public funding. DM is usually administered by medical prescription to preterm infants that have been born at a gestational age of ≤ 32 weeks or with birth weight $< 1,500$ g, whose mothers cannot provide enough milk for any reason.

Although unfortified human milk may meet the nutritional needs in extremely preterm infants for the first two weeks of life, its protein, calcium, phosphorus and sodium content is inadequate from the nutritional point of view, and it must be supplemented (Henderson, 2005). The fortification of human milk allows a greater growth rate and bone mass index in extremely preterm infants (< 32 gestational weeks). Human milk fortifiers are powders or liquids with different compositions that provide a protein (or amino acids) and mineral supplement, and that also contain carbohydrates and vitamins in different amounts. Fortified human milk should provide between 80 and 85 kcal/100 ml and additional sodium, calcium and phosphorus (Bustos, 2008). Usually, fortifiers are used once the exclusive enteral feeding has been reached with good tolerance. Infant formulas represent the third option for feeding preterm infants and they should be used as a last resort when no OMM or DM are available.

During the progression of the preterm towards the ideal of full and direct breastfeeding, premature infants can go through several stages in which they receive various types of nutrition: parenteral, enteral and oral. The parenteral nutrition through a central or peripheral catheter is used when there is no other feasible method of feeding and its main drawback is the high risk of acquiring an infection. Enteral nutrition refers to intragastric administration of any liquid or food through a naso- or orogastric system. This technique is applied to preterm infants born at a gestational age of ≤ 32 weeks but it can be extended up to 35-week gestational age, depending on the stage of preterm's development (Bustos, 2008). It is desirable that the feed is not maintained continuously for more than 4 h because the milk lipid fraction adheres to the tubes walls, modifying the delivery of milk nutrients. Fractional feeding in the preterm infant, leaving fasting periods, reduces the lap time to reach full enteral nutrition in preterm infants (Premji and Chessell, 2011).

The intestinal microbiome is responsible for a large set of functions that our eukaryotic cells did not have to acquire during the evolutionary process (Qin et al, 2010; Xu and Gordon, 2003). Human gut microbiota contains bacteria, viruses, bacteria, archaea, molds, yeasts, protozoa and nematodes, and it is not isolated but in a constant and complex biochemical-immunological-neurological interaction with other cells and substances present in the gastrointestinal tract. At the phylum level, the gut microbiota of a healthy adult displays relatively low diversity, as representatives of the *Firmicutes* and *Bacteroidetes* phyla constitute over 80% of its components, while *Actinobacteria*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia* are found in smaller percentages (Arumugam et al, 2011; Yatsunenko et al, 2012). However, the intestinal microbiota

exhibits a high diversity at the species and strain taxonomic levels, harboring hundreds of species (with an average of over 150 per individual) and thousands of strains, and showing a high individual variability (Human microbiome Project Consortium, 2012; Qin et al, 2010).

The establishment of the intestinal microbiota is a progressive process that has been addressed in numerous studies. However, studies about its evolution from childhood to elderly have only recently been addressed. Bacterial colonization of the human gut is a complex process that starts, at a small scale, *in utero*, during the last stages of the fetal period. After birth, microbial colonization intensifies dramatically due to the contact of the newborn with microorganisms from the maternal vaginal, intestinal and/or breast milk microbiota and, also, from the environment (Buddington et al., 2010; Mackie et al., 1999; Martin et al., 2007a; Martin et al., 2009). Consequently, several factors, such as mother's microbiota composition, gestational age, type and place of birth, medication (specially antibiotics) or type of feeding, play key roles in a crucial process that determines important functions including nutrient absorption, formation of a barrier against pathogens and immune system development (Hooper and Gordon, 2001; Martino et al., 2008). At present, there is great interest in studying infant microbiota establishment and its influence on the infant's transcriptome, proteome and/or metabolome. However, knowledge on this area is scarce and this is particularly pronounced in the case of preterm infants (Schwiertz et al., 2003).

The immaturity of the preterm infant is manifested mainly by their inability to maintain a constant body temperature, susceptibility to infections, breathing difficulties, lack of reflexes necessary for survival (like sucking or swallowing) and, lastly, digestive intolerance to foods different than breast milk. However, advances in Neonatology have reduced the mortality and morbidity of preterm infants significantly in developed countries. Even though, there are many factors that can alter the process of gut colonization of preterm infants, including mother's antibiotic treatment immediately before delivery (for suspected chorioamnionitis, premature rupture of membranes or rectovaginal colonization by *Streptococcus agalactiae*), empiric postnatal treatment with antibiotics (Madan et al., 2012; Schumann et al., 2005), increased frequency of cesarean delivery (again with antibiotic administration to the mother), mother-infant separation, invasive procedures (nasogastric tubes, endotracheal tubes, vascular accesses) and long stays in the NICU, where there is a high prevalence of potentially pathogenic microorganisms linked to the hospital environment (Westerbeek et al., 2006). In any case, published studies are scarce and suggest that all these factors cause major distortion in the colonization pattern of the neonatal gut which is defined as aberrant and having negative consequences for the mother-child pair (Tanaka et al., 2009; Barret et al., 2013).

Globally, these gut microbial disorders are characterized by an increase in the prevalence of potentially pathogenic bacteria, very high variability among individuals and reduced microbial diversity compared to full-term infants (Chang et al., 2011; Jacquot et al., 2011). The gastrointestinal microbiota of preterm infants often contains lower amounts of lactobacilli and strict anaerobes, such as *Bifidobacterium* and *Bacteroides*, and higher amounts of bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* family (Barrett et al., 2013; Jacquot et al., 2011; LaTuga et al., 2011; Penders et al., 2006). Finally, the microorganisms with the highest prevalence in the preterm infant

gut are the same that also show the highest prevalence in the hospital environment (*Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. agalactiae*, *viridans* group streptococci, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Candida albicans* and other yeast), and can form complex polymicrobial consortia (Mai et al., 2011; Moles et al., 2013; Normann et al., 2013; Schwiertz et al., 2003). These consortia have the potential to build up biofilms and to exchange antibiotic resistance or virulence genes (Beaussart et al., 2013; Logan et al., 2013; Macnow et al., 2013; Otto et al., 2013). A better understanding of these relationships will also facilitate the development of new tools for controlling infections in the NICU.

Bacteria of the genus *Klebsiella* are particularly important as opportunistic pathogens in hospitalized patients. In fact, *Klebsiella* spp. represent between 3% and 8% of all nosocomial bacterial infections and they are the second most common cause of nosocomial infections due to Gram-negative bacteria, after *E. coli* (NNIS, 2000; Podschun y Ullmann, 1998). On the other hand, some studies have shown that *Klebsiella* spp. may be a part of the normal human milk microbiota in healthy individuals where they act as a commensal, mutualistic or even potentially probiotic bacteria for the infant gut (Heikkilä y Saris, 2003; Jimenez et al., 2008a; Jimenez et al., 2008b; Martin et al., 2003).

XI.2 OBJECTIVES

Accordingly, the objectives of the research work for this PhD Thesis were:

1. To assess the bacterial diversity and several immunological parameters in meconium and feces of preterm infants during their stay in the neonatal intensive care unit (NICU) and, later, in feces when they were 2-year old, using a combination of culture-dependent and culture-independent techniques.
2. To determine the influence of enteral feeding systems in the gut colonization of preterm infants during their stay at the NICU.
3. To characterize a collection of strains of the genus *Klebsiella* isolated from a neonatal sepsis outbreak in a NICU, to compare their properties with those of *Klebsiella* spp. isolated from other sources, and to search for different features enabling the distinction between potentially pathogenic and commensal strains.

XI.3 MATERIAL AND METHODS

This prospective study to assess the acquisition and evolution of preterm infant gut microbiota included 26 babies born at <32 weeks gestational age at the Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid (Spain). The exclusion criteria included the following: a) children born outside the institution and, then, taken to the hospital; b) children born with major malformations or suspected or confirmed genetic disorders; and c) parents considered incapable of understanding the informed consent. Written informed parental consent was obtained for each preterm before inclusion. The Ethical Committee on Clinical Research of the Hospital Clínico San Carlos of Madrid approved all study protocols (10/017-E).

The following samples were taken:

- (a) Feces: taken in account that preterm stools are loose and/or liquid, the whole diaper was taken, folded and inserted in a sterile bag that was immediately labeled and sealed before being stored under refrigeration at 5 °C. Once the sample arrived at the laboratory, a cast was used to take exactly and reproducibly the same surface of the internal side of the diaper; the piece was weighted and the fecal material present in the piece was suspended in peptone water. To rule out microorganisms that could be present previously in the diaper, a non-used control diaper from the same batch was also introduced in a sterile bag, labeled, sealed, stored under refrigeration at 5 °C, and processed as described before.
- (b) Breast milk, donor milk and preterm infant formula: a sample (3 ml) of the fluid after its passage through the external tube of the enteral feeding system.

All samples were sent at the laboratory within four hours keeping the cold chain (4 – 5 °C) using a courier service hired specifically for this study. Samples were taken weekly from the day they were born to their hospital discharge or transfer to another health care institution.

Bacterial diversity in all biological samples was studied using culture-based analysis. Samples were diluted in peptone water and adequate dilutions were spread onto eight different culture media: Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK; a general medium for total aerobic bacterial count), MacConkey (MCK; ; BioMerieux, Marcy l'Etoile, France; a selective medium for isolation of enterobacteria), Sabouraud Dextrose Chloramphenicol (SDC, BioMerieux; a selective medium for isolation of yeasts and molds), Columbia Nadilixic Acid Agar (CNA, BioMerieux; a general medium for isolation of bacteria with specific nutritional requirements), Baird Parker (BP, BioMerieux; a selective medium for isolation of staphylococci), Wilkins-Chalgren (WCh, Oxoid; a general medium for isolation anaerobic bacteria), de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS, Oxoid; a selective media for isolation of lactic acid bacteria), and anaerobic MRS supplemented with 0.5% of cysteine (MRS-Cys; a selective media for isolation of estrict anaerobic lactic acid bacteria and bifidobacteria). BHI, MCK, SDC, CNA, BP, and MRS plates were incubated aerobically at 37 °C for up to 24 - 48 h. Parallel, WCh and MRS-Cys plates were anaerobically incubated (85% nitrogen, 10% hydrogen, 5% carbon dioxide) in an anaerobic workstation (Mini-MACS DW Scientific) at 37 °C for up 48-72 h.

After bacterial counting, at least one colony of each different observed morphology (color, size, shape, halo...) from each culture medium was isolated. These isolates were grown in BHI or MRS broth and stored at -80 °C in the presence of glycerol (30%, v/v).

All selected isolates were analyzed by optical microscopy to determine cell morphology and Gram-staining reaction. Additionally, their oxidase, catalase and coagulase activities as well as their growth in Baird Parker (BP, BioMerieux; a selective medium for isolation of staphylococci) and Kanamycin Aesculin Azide Agar (KAA, Oxoid; a selective medium for isolation of enterococci) were tested.

Initially, most of the isolates that, on the basis of preliminary tests, seemed to belong to the Genus *Staphylococcus* were identified as *S. epidermidis*, *S. aureus* or *Staphylococcus hominis* by a multiplex PCR method based on the *dnaJ* genes. Briefly, one colony of the tested isolate was suspended in 50 µl of sterile deionized water. Then 50 µl of chloroform/isoamyl alcohol (24:1) were added to the suspension and the mixture was centrifuged at 16.000× g for 5 min. at 4 °C. Subsequently, 5 µl of the superior aqueous-phase were used as the DNA source for PCR amplification in a thermocycler Icyclor (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA). Primers J-StGen (5'-TGGCCAAAAGAGACTATTATGA-3'), J-StEpi (5'-CCACCAAAGCCTTGACTT-3'), JStAur (5'-GGATCTCTTTGTCTGCCG-3') and JStHom (5'-TTGACCACTACCCTCACAC-3') were used for amplification. Pair primers J-StGen/J-StAur, J-StGen/J-StEpi, and J-StGen/J-StHom, specifically amplified fragments of *S. aureus* (337 bp), *S. epidermidis* (249 bp), and *S. hominis* (589 bp), respectively. PCR conditions were as follows: one cycle for 1 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 30 s denaturation at 94 °C, annealing for 30 s at 60 °C and extension for 30 s at 72 °C, and a final extension for 5 min at 72°C.

On the other hand, most of the isolates that seemed to belong to the genus *Enterococcus* were identified by PCR species-specific detection of enterococcal *ddl* genes, which encode D-alanine: D-alanine ligases, following the protocol described by Dutka-Malen et al. (1995). For this purpose, four primers were used: E1 (5'-TCAAGTACAGTTAGTCTT-3'), E2 (5'-ACGATTCAAAGCTAACTG-3'), F1 (5'-GCAAGGCTTCTTAGAGA-3') and F2 (5'-CATCGTGTAAGCTAACTTC-3'). The first pair (E1 and E2) specifically detects *E. faecium* strains, while the second (F1 and F2) is specific for *E. faecalis*. For this purpose, PCR conditions were as follows: one cycle for 2 min at 94 °C, followed by 25 cycles of 1 min denaturation at 94 °C, annealing for 1 min at 54 °C and extension for 1 min at 72 °C, and a final extension for 1 min at 72 °C.

PCR products were electrophoresed in an agarose (1.5 - 2%) gels at 90 V for 45 min, using a 1 kb ladder (Bioline, London, UK) as marker, stained in Gel Red Nucleic Acid Stain (Biotium, Hayward, CA, USA), and visualized on a Gel Doc 2000 gel documentation system (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Identification of other isolates was performed by PCR sequencing of a 16S rRNA fragment (490 bp) using the procedure, primers, and conditions described by Kullen et al. (2000). The resulting amplicons were purified using the Nucleospin® Extract II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and sequenced at the Unidad de Genómica of the Universidad Complutense de Madrid (Parque Científico de Madrid). Sequences were used to search sequences deposited in the EMBL database using

BLAST algorithm and the identity of the isolates was determined on the basis of the highest scores (>98%).

Subsequently, isolates belonging to the same bacterial species and sample were typified using the Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique. DNA was extracted as described above and was used as a template to obtain its RAPD profile using primer OPL5 (5'-ACGCAGGCAC-3') (Ruiz-Barba et al., 2005). After amplification, amplicons were separated in agarose (2 %) gels and visualized on a Gel Doc 2000 gel documentation system. Band profiles were analyzed using the InfoQuest FP software (Bio-Rad) and the UPGMA cluster analysis using Dice coefficient. This analysis allowed to discard duplicate isolates from the same sample, since only one representative from each profile was selected, and, also, to know if there was a mother-to-child transfer of certain bacterial strains.

To study meconium and fecal microbiota a culture-independent technique, a DNA microarray known as *Human Intestinal Tract Chip* (HITChip, Laboratory of Microbiology, Wageningen University, Netherlands), was used. Previously, total DNA was extracted from samples after they were thawed at room temperature. For that purpose, 0.1 g of meconium or feces were resuspended in 0.5 ml of extraction buffer (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% SDS, 25 mM EDTA, 250 mM NaCl, 20 mg/ml lysozyme, 5 µg/ml lysostaphin) and 0.3 ml of 3 M Na acetate. Then, mechanical lysis was performed by three cycles of bead-beating with 0.1 mm diameter zirconia/silica beads (Sigma, St. Louis, MO, USA) using a FastPrep disruptor (QBioGene, Irvine, CA, USA) at a speed setting of 6 m/s for 30 s. The lysate solution was treated with 0.1 mg/ml of proteinase K (Sigma), and incubated for 30 min at 37 °C. Following incubation, 0.1 ml of 1.5 M NaCl was added to the lysate and mixed. After incubation for 5 min at room temperature, the mixture was centrifuged at 16,000 ×g to pellet the insoluble cell debris. The supernatant was transferred into a new tube and extracted twice with an equal volume of phenol/chloroform/isoamyl-alcohol (25:24:1) (Sigma). The DNA was precipitated by adding 0.6 volumes of isopropanol (Sigma) and incubating at -20°C for 1 h. The DNA was pelleted, washed with 70% ethanol, allowed to air dry, and finally resuspended in TE buffer. The DNA yield and quality was measured using a NanoDrop® ND-1000 UV spectrophotometer (Nano-Drop Technologies, Wilmington, DE, USA).

The HITChip DNA microarray includes over 4,800 oligonucleotide probes targeting the V1 and V6 hypervariable regions of the 16S rRNA gene from 1,132 phylotypes, spotted in duplo on custom 8×15K format arrays (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE.UU.). The array probes were organized based on their 16S rRNA sequences on three levels of phylogeny: 1) level 1 corresponds to the phylum; in case of *Firmicutes* to the *Clostridium* cluster and other classes making up to 23 groups; 2) level 2 includes 131 groups of sequences with 90% or more sequence similarity at the genus level; and 3) level 3 represents unique phylotypes that were defined as species for cultivated microorganisms, or representatives of each monophyletic group with >98% sequence identity for clones corresponding to uncultured microorganisms. Taxons at the genus level displaying ≥90% identity to multiple genus are named “et rel.”

All the steps for the HITChip DNA microarray analysis, including PCR amplification of 16S rRNA genes, RNA production and labeling, hybridization and data extraction, normalization and analysis were performed basically as described by

Rajilic-Stojanovic et al. (2009). Data were extracted from the microarray images using the Agilent Feature Extraction software, version 9.1 (<http://www.agilent.com>), subsequently normalized, and further analyzed using a set of R-based scripts (<http://r-project.org>) in combination with a custom-designed relational database that runs under the MySQL database management system (<http://www.mysql.com>; [34]). Hierarchical clustering of probe profiles was carried out using the Pearson distance and Ward's minimum variance method.

The concentration of 18 cytokines, chemokines, and growth factors including IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12(p70), IL-13, and IL-17, interferon-gamma (IFN- γ), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), growth regulated oncogene-alpha (Gro- α), MCP-1, MIP-1 β and TNF- α , were determined in meconium and fecal samples by using the Human Cytokine group I and II assay kits (Bio-Rad) in a Bioplex 200 system instrument (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). At the same time, The concentration of IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM and IgA in the meconium and fecal samples was determined using the Bio-Plex Pro Human Isotyping Assay kit (Bio-Rad) in the equipment.

A total of 57 *Klebsiella* spp. isolates were characterized during this Thesis. All isolates were identified by PCR sequencing of a 454 bp fragment of the *rpoB* gene. In the case of phylogenetic analysis, the *rpoB* sequences obtained (454 bp) were aligned by using the Clustal W method (Thompson et al., 1994) with the MEGA5 (Version 5.2.1) software (Tamura et al., 2007). Phylogenetic trees were constructed based on the neighbour-joining method with the Jukes-Cantor parameter model (Saitou y Nei, 1987). Presence of several genes such as *magA*, *rmpA*, *wabG*, *uge*, *kfu* and *fimH* encoding potential virulence factors of *K. pneumoniae* was determined by PCR using target-specific primers.

Additionally, in order to determine their plasmid profiles, small size plasmids were extracted using QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, Hilden, Germany) kit and large size plasmids (>16 kb) were extracted using PFGE-S1 nuclease digestion (Takara Bio Inc, Shiga, Japan).

On the other hand, all isolates identified as *Klebsiella* spp. were genotyped by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) according to the method described by Kaufmann et al. (1998).

Finally, minimal inhibitory concentrations (MICs) to several antibiotics were evaluated by a microdilution method using Sensititre EMIZA 9EF plates (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, USA) following the manufacturer's instructions. Production of extended spectrum β -lactamases (ESBL) was tested by the double-disk synergy test (Jarlier et al., 1988). The presence of CTX-M ESBL-encoding genes (*bla*_{CTX-M}) was done by multiplex PCR.

For statistical analysis, quantitative data were expressed as the mean and 95% confidence interval (CI) of the mean or, when they were not normally distributed, as the median and interquartile range (IQR). The richness and diversity of the preterm infants' meconium and fecal microbiota were determined by calculating the Shannon-Weaver diversity index, which takes into account the number and evenness of the bacterial species. Fisher's exact test and the Freeman-Halton extension of the Fisher exact probability test for 2 \times 3 contingency tables were used to compare proportions.

Friedman's non-parametric repeated measures comparisons and paired samples *t*-tests were applied to determine differences between the bacterial counts of each identified microbial group or the hybridization signal intensities of genus-like bacterial groups across time. Principal component analysis (PCA) was applied to the dataset gathering the microbiological profile of all meconium and feces samples obtained after culture methods, to group samples according to their characteristics. Exploratory multivariate analyses of data, such as principal component analysis (PCA), discriminant analysis (DA) and clustering analysis of immune compounds were carried out. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Statgraphics Centurion XVI version 16.1.15 (Statpoint Technologies Inc., Virginia, USA) and R 2.13.2 (R project, Statistical Software) software were used to carry out the analyses cited above.

XI.4 RESULTS

In this study, 17 meconium and 128 fecal samples were collected during the hospital stay of the infants that participated in the study (on average, 6.4 samples per infant). The bacterial diversity present in these samples was analyzed by culture-dependent and culture-independent techniques. Culture-dependent techniques allow the isolation, quantification and characterization of cultivable bacteria while molecular techniques give more detailed information about the bacterial diversity of the samples. Parallel, 135 samples of the three types of food used to feed the preterm infants (OMM, n=85; DM, n=35; or infant formula, n=15) were taken after their passage through the external feeding tube (EFT) of the enteral feeding system. In this case, their microbiological composition was assessed exclusively using culture-based methods. Approximately 4,000 isolates were identified at the species level.

Overall, the results obtained by culture-depending techniques on the one hand, and the microarray HITChip other, were very similar although the former showed less sensitivity. In general, a high inter-individual variability was observed although meconium microbiome profiles were different from those observed in fecal samples. Culture-dependent techniques showed that *Staphylococcus* predominated in meconium while *Enterococcus* and some Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Escherichia fergusonii*, *K. pneumoniae* and *S. marcescens*, were more abundant in the fecal samples. On the other hand, HITChip analysis revealed that *Bacilli* and other *Firmicutes* were the main bacteria groups detected in meconium while *Proteobacteria* dominated in the fecal samples. Sequences related to *Lactobacillus plantarum* and *Streptococcus mitis* were the most abundant in meconium samples whereas those related to *Enterococcus* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Yersinia* spp. predominated in the 3rd week feces. The diversity of the microbial communities, as assessed using the Shannon-Weaver index, was lower in meconium (0.42) than in the fecal (1.19-1.35) samples.

Globally, the same bacterial profile could be observed in the three different types of food (OMM, DM, and formula milk) used to feed the preterm infants after their passage through the EFT. *Staphylococcus* was the genus most frequently isolated from OMM samples (93%) in contrast with the DM and formula ones where it was present only in 37% and 11% of the samples, respectively. *Enterococcus* was the Gram-positive genus most frequently found in the DM and formula samples (49% and 27%, respectively) but it could also be isolated from a high percentage (61%) of the OMM samples. Some Gram-negative bacteria, such as *E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp., were also isolated from the three food types, too. In contrast, bifidobacteria could only be detected in two OMM samples. Mean bacterial counts of *Enterococcus*, *Staphylococcus* and *Serratia* were significantly higher in OMM samples (5.03, 4.82 and 5.58 log₁₀ CFU/ml, respectively) than in the other two types of feed. The dominant species in both preterm feces and milk samples were *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *S. marcescens*, *K. pneumoniae* and *E. coli*. Subsequently, scanning electron microscopy revealed the presence of a dense bacterial biofilm, composed basically of the bacterial species cited above, in several parts of the enteral feeding systems.

Potential associations between demographic and clinical parameters and isolation of the different genera were assessed using the Fisher's test. The isolation of

the genus *Serratia* seemed to be strongly influenced by demographic or clinical variables related to prematurity while the presence of *E. coli* was higher in fecal samples from infants with a lower degree of prematurity.

The analysis of feces when the infants were 2-year-old revealed that those bacterial genera associated with the hospital environment (*E. coli*, *Klebsiella* spp. or *Serratia* spp.) that were dominant in feces obtained during their stay at the NICU had been replaced by genera belonging to *Clostridium* cluster IV and cluster XIVa. These two bacterial groups are dominant in the fecal microbiota of healthy adults, which is adapted to a low redox potential and produces a high amount of short chain fatty acids.

Globally, the values obtained for all the immune factors analyzed in this study showed a high interindividual variability reflected in both detection frequencies and concentration of a wide range of cytokines, chemokines, growth factors and immunoglobulins. Meconium samples showed a lower concentration of all these immune compounds in comparison with the fecal samples, except for MIP-1 β and GM-CSF.

Finally, the phylogenetic analysis of a partial sequence of the *rpoB* gene was useful to identify isolates belonging to the species *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola* and *Raoultella planticola*. PFGE genotyping of these isolates revealed a wide genetic diversity although no differences were found regarding the presence of several genes (*magA*, *rmpA*, *wabG*, *uge*, *kfu* and *fimH*) encoding potential virulence factors of *K. pneumoniae*, including the enterobactin, aerobactin and yersinbactin siderophores. However, the antibiotic susceptibility profiles of *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *K. variicola* strains isolated from a nosocomial outbreak were ESBLs producers and exhibited resistance to a wide spectrum of clinically relevant antibiotics. Analysis of PFGE profiles of ESBL producers, which were isolated from the neonatology service over a period of six months, revealed the existence of a polyclonal outbreak. The CTX-M-15 ESBL-producing *K. pneumoniae* strains harbored a plasmid of 75 kb. In addition, two *K. pneumoniae* strains produced bacteriocins with antimicrobial activity against *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *K. variicola*, including those implicated in the nosocomial outbreak.

XI.5 DISCUSSION

The process of acquisition and evolution of the infant gut microbiota is affected by several factors, such as gestational age, mode of delivery, diet or medical treatments, and has important consequences for human health (Blaut and Clavel, 2007; Murgas et al., 2011). The combination of culture analysis and culture-independent techniques to study the succession of the bacterial species in meconium and feces of preterm infants in their first 3 weeks of life showed a good correlation and provided highly complementary views. Globally, inter-individual differences were detected in the microbiota profiles. Furthermore, the meconium microbiota was less diverse and distinct when compared with that of fecal samples from preterm infants, which is in agreement with previous studies (Magne et al., 2006).

Premature birth usually results in a delayed and abnormal qualitative pattern of gut colonization, which is often described as aberrant in comparison to that of healthy term ones (Koenig et al., 2011). This fact seems to affect infant's health and constitutes a risk factor for the development of gastrointestinal infections, such as necrotizing enterocolitis (Claud and Walker, 2001). In a recent study, preterm infants who developed sepsis showed a *Proteobacteria* and *Firmicutes* predominance, while more healthy subjects exhibited an increase in relative abundance of anaerobes, similarly to more 'mature' microbial communities (*Clostridium*, *Klebsiella* and *Veillonella*) (Madan et al., 2012).

The fecal microbiota of preterm infants is usually dominated by cultivable bacteria that are prevalent in antibiotic-rich hospital environments, such as NICU. In this Thesis, presence of *Serratia* was strongly associated with several hospital-related parameters, including antibiotherapy and mechanical ventilation. Fear of infections often leads to an early and widespread use of broad-spectrum antibiotics at the NICU, a strategy that reduces bacterial diversity and increases the risk of colonization with resistant bacterial strains.

The results obtained in this Thesis indicate that spontaneously-released meconium of preterm neonates harbors a specific microbiota that differs from that of feces obtained after the first weeks of life. Probably, such bacteria could reach the fetal gut through *in utero* swallowing of amniotic fluid. Previous studies have reported that bacteria of the digestive tract can reach amniotic fluid through the blood stream and, in fact, influence the pregnancy outcome (Dasanayake et al., 2005; Kornman and Loesche, 1980). Streptococci and staphylococci seemed to be among the dominant bacteria in the meconium samples and, interestingly, their presence in chorioamnion samples of healthy mothers submitted to caesarean section has been described previously (Bearfield et al., 2002; Jimenez et al., 2005). The potential existence of initial gut colonization during the fetal stage deserves future research since it could have important health implications; as an example, its modulation during pregnancy could help to avoid premature deliveries.

Few studies have considered the role of neonatal nasogastric enteral feeding tubes (NEFT) as a site of bacterial colonization and, as a consequence, as a source of bacteria for preterms. The presence of staphylococci (*S. epidermidis*, *S. aureus*), enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*) and *Enterobacteriaceae* (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *E. coli*...), including

clones harboring antibiotic resistance genes, in the inner wall of enteral feeding tubes has been reported in several studies (Mehall et al., 2002a; Mehall et al., 2002b; Hurrell et al., 2009). The same or closely related microorganisms could be detected in our study in the external feeding tubes (EFT) as well as in OMM, DM or preterm infant formula samples after their pass through the EFT.

The major bacteriological difference between OMM and the other two food types was the isolation frequency and concentration of staphylococci (mainly *S. epidermidis*), which were significantly higher among OMM samples. Staphylococci constitute, at least quantitatively, the first bacterial group found in the microbiome of human milk (Hunt et al., 2011; Jost et al., 2013; Ward et al., 2013). Previously, *S. epidermidis* has been shown to be the most prevalent species both in human milk and in feces of breastfed infants while it is practically absent in those of formula fed-infants (Jimenez et al., 2008). Interestingly, staphylococci seem to be the bacteria with the highest ability to use human milk oligosaccharides (Hunt et al., 2012).

Despite differences in bacterial diversity and concentrations, a common bacterial pattern was observed in the three types of feed after their pass by the EFTs. This may reflect the enteric contamination from the NEFT at the connector level and, also, the remains of bacteria present in non-heated milk since different types of feed may be administered to the same neonate through the same EFT. Therefore, the practice of prolonged placement of NEFTs, EFTs or connectors in neonates needs to be reconsidered.

Scanning electron microscopy analysis of the internal surfaces of some sets of EFT, connectors and NEFT revealed that complex microbial biofilms were formed when such devices were placed for, at least, more than 12 h. The inner portion of the NEFT can be kept at 37 °C and can be in place for more than 48 h, acting as a significant amplifying step for opportunistic pathogens arising from the host gastrointestinal tract (Hurrell et al., 2009). As biofilms age, bacteria will break off in clumps which, subsequently, will inoculate any feed in the tube lumen leading to further bacterial multiplication and to the reinoculation of the preterm gut with the same hospital-related microbiota. The results of this Thesis suggest that there may be a direct relationship between the hospital-associated bacterial species that integrated the thick biofilms formed in the feeding tubes and their presence, at high concentrations, in feces of the preterm neonates.

The correct identification of *Klebsiella* spp. isolates is very important from an epidemiological and clinical point of view but it is not possible using traditional molecular methods such as sequencing of 16S rDNA gene due to scarce nucleotide variation. In this Thesis, the amplification and partial sequencing of a 454 bp fragment of the *rpoB* gene allowed the correct identification of the *Klebsiella* spp. isolates, as previously reported (Drancourt et al., 2001). A high genetic diversity was found among the commensal and the bacteraemic isolates in this study, whereas that found in the isolates from the NICU strongly suggested a clonal dissemination.

Globally, all *Klebsiella* strains analyzed were sensitive to most of the antibiotics assayed in this study, with the exception of *bla*_{CTX-M-15}-producing isolates from the NICU. ESBL-producing *K. pneumoniae* can cause infection outbreaks in NICU (Mantilla et al., 2006; Kristof et al., 2007). In addition some isolates exhibited resistance to carbapenems, in agreement with other studies that have shown wide

dispersion of carbapenemases combined or not with ESBL among different environments (Nordmann et al., 2009).

One potential strategy to modulate the process of the establishment of gut microbiota in preterm infants is the application of probiotics that are specifically selected for this population; the probiotic administration could start even during pregnancy. The number of studies on the effects of probiotics in preterm infants has increased considerably in the last years. Significantly, the safety of probiotics has been demonstrated in all these studies. Moreover, all published meta-analysis indicate that probiotics have a positive impact on various clinical parameters, including a significant decrease in the NEC incidence and death from any cause (AlFaleh et al., 2011; Janvier et al., 2014). A promising alternative for probiotic application is the development of synthetic microbial communities that are specific for a particular niche. These synthetic microbiotas consist of complex mixtures of viable strains that resemble, for example, the natural microbiota of breast milk or the feces of healthy infants. Undoubtedly, this approach has great appeal for the prevention and treatment of infections in preterm infants considering the increasing emergence of multidrug-resistant pathogenic bacteria.

XI.6 CONCLUSIONS

The conclusions obtained in this research work are the following:

First. The fecal microbiota of preterm infants shows a high degree of interindividual variability and is characterized by sharp fluctuations during the first weeks of life. In general, it is less diverse than that of term infants and is dominated by hospital-associated bacteria, including those belonging to the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Escherichia*. Furthermore, colonization by lactobacilli and bifidobacteria seems to be very low during the period of hospitalization.

Second. Overall, these events may reflect the prolonged stay of infants in neonatal units characterized by a high prevalence of hospital environment microorganisms, such as those belonging to the genera mentioned above. The enteral feeding systems may contribute to the persistence of such bacteria in the preterm gastrointestinal tract.

Third. The diversity of the fecal microbiota of the infants that were born prematurely increases when they are 2-year-old reaching the values described at the same age for children born at term. Globally, there is a substitution of some of the hospital-associated bacteria by other bacteria that are typically associated to the gut microbiota of healthy adults.

Fourth. The sequencing of the *rpoB* gene is a valuable tool for the identification, at the species level, of those isolates belonging to the genus *Klebsiella*. The phenotypic and genotypic tools available at present do not allow a clear differentiation between commensal and potentially pathogenic strains. However, antibiotic multiresistance may explain the therapeutic failure in those hosts that are particularly vulnerable to infections, such as preterm infants.

XI.7 REFERENCES

- Agostoni, C., Braegger, C., Decsi, T., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K. F., et al. (2009). Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(1), 112-125.
- American Academy of Pediatrics. (2012). Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*, 129(3), e827-41.
- AlFaleh, K., Anabrees, J., Bassler, D. & Al-Kharfi, T. (2011). Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*, 3(3), CD008991.
- Arslanoglu, S., Corpeleijn, W., Moro, G., Braegger, C., Campoy, C., Colomb, V., et al. (2013). Donor human milk for preterm infants: Current evidence and research directions. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 57(4), 535-542.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., et al. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- Ballard, O. & Morrow, A. L. (2013). Human milk composition: Nutrients and bioactive factors. *Pediatric Clinics of North America*, 60(1), 49-74.
- Barrett, E., Kerr, C., Murphy, K., O'Sullivan, O., Ryan, C. A., Dempsey, E. M., et al. (2013). The individual-specific and diverse nature of the preterm infant microbiota. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 98(4), F334-40.
- Bearfield, C., Davenport, E. S., Sivapathasundaram, V. & Allaker, R. P. (2002). Possible association between amniotic fluid microorganism infection and microflora in the mouth. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 109(5), 527-533.
- Beaussart, A., Herman, P., El-Kirat-Chatel, S., Lipke, P. N., Kucharikova, S., Van Dijck, P., et al. (2013). Single-cell force spectroscopy of the medically important *Staphylococcus epidermidis*-*Candida albicans* interaction. *Nanoscale*, 5(22), 10894-10900.
- Beck, S., Wojdyla, D., Say, L., Betran, A. P., Merialdi, M., Requejo, J. H., et al. (2010). The worldwide incidence of preterm birth: A systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, 88(1), 31-38.
- Blaut, M. & Clavel, T. (2007). Metabolic diversity of the intestinal microbiota: Implications for health and disease. *The Journal of Nutrition*, 137(Suppl 2), 751S-755S.
- Blencowe, H., Cousens, S., Oestergaard, M. Z., Chou, D., Moller, A., Narwal, R., et al. (2012). National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: A systematic analysis and implications. *The Lancet*, 379(9832), 2162-2172.
- Blencowe, H., Lawn, J. E., Vazquez, T., Fielder, A. & Gilbert, C. (2013). Preterm-associated visual impairment and estimates of retinopathy of prematurity at regional and global levels for 2010. *Pediatric Research*, 74(S1), 35-49.
- Buddington, R. K., Williams, C. H., Kostek, B. M., Buddington, K. K. & Kullen, M. J. (2010). Maternal-to-

- infant transmission of probiotics: Concept validation in mice, rats, and pigs. *Neonatology*, 97(3), 250-256.
- Bustos, G. (2008). Alimentación enteral del recién nacido pretérmino. *Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos De La AEP: Neonatología. Asociación Española De Pediatría Y Sociedad Española De Neonatología. Madrid: AEP*, 58-67.
- Chang, J. Y., Shin, S. M., Chun, J., Lee, J. H. & Seo, J. K. (2011). Pyrosequencing-based molecular monitoring of the intestinal bacterial colonization in preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 53(5), 512-519.
- Ciliborg, M. S., Boye, M. & Sangild, P. T. (2012). Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Human Development*, 88, S41-S49.
- Claud, E. C. & Walker, W. A. (2001). Hypothesis: Inappropriate colonization of the premature intestine can cause neonatal necrotizing enterocolitis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(8), 1398-1403.
- Dasanayake, A. P., Li, Y., Wiener, H., Ruby, J. D. & Lee, M. J. (2005). Salivary *Actinomyces naeslundii* genospecies 2 and *Lactobacillus casei* levels predict pregnancy outcomes. *Journal of Periodontology*, 76(2), 171-177.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carta, A. & Rousselier, P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 925-932.
- Dutka-Malen, S., Evers, S. & Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(1), 24-27.
- Eidelman, A. I. (2012). Breastfeeding and the use of human milk: An analysis of the American Academy of Pediatrics, breastfeeding policy statement. *Breastfeeding Medicine*, 7(5), 323-324.
- Espinosa-Martos, I., Moles, L., Manzano, S., Fernández, L., Montilla, A., Corzo, N., et al. (2014). Bacteriological, biochemical and immunological properties of colostrum and milk from mothers of extremely preterm infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, in press.
- Espinosa-Martos, I., Montilla, A., de Segura, A. G., Escuder, D., Bustos, G., Pallas, C., et al. (2013). Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after holder pasteurisation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 56(5), 560-568.
- Fernandez, L., Langa, S., Martin, V., Maldonado, A., Jimenez, E., Martin, R., et al. (2013). The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), 1-10.
- García-Lara, N., García-Algar, O. & Alonso, C. R. P. (2012). Sobre bancos de leche humana y lactancia materna. *Anales De Pediatría: Publicación Oficial De La Asociación Española De Pediatría (AEP)*, 76(5), 247-249.

- Heikkilä, M. P. & Saris, P. E. (2003). Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal of Applied Microbiology*, 95(3), 471-478.
- Henderson, A. (2005). Vitamin D and the breastfed infant. *Journal of Obstetric, Gynecologic & Neonatal Nursing*, 34(3), 367-372.
- Hooper, L. V. & Gordon, J. I. (2001). Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science*, 292(5519), 1115-1118.
- Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207-214.
- Hunt, K. M., Foster, J. A., Forney, L. J., Schutte, U. M., Beck, D. L., Abdo, Z., et al. (2011). Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PloS One*, 6(6), e21313.
- Hunt, K. M., Preuss, J., Nissan, C., Davlin, C. A., Williams, J. E., Shafii, B., et al. (2012). Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4763-4770.
- Hurrell, E., Kucerovala, E., Loughlin, M., Caubilla-Barron, J., Hilton, A., Armstrong, R., et al. (2009). Neonatal enteral feeding tubes as loci for colonisation by members of the enterobacteriaceae. *BMC Infectious Diseases*, 9, 146-2334-9-146.
- Jacquot, A., Neveu, D., Aujoulat, F., Mercier, G., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., et al. (2011). Dynamics and clinical evolution of bacterial gut microflora in extremely premature patients. *The Journal of Pediatrics*, 158(3), 390-396.
- Janvier, A., Malo, J. & Barrington, K. J. (2014). Cohort study of probiotics in a North American neonatal intensive care unit. *The Journal of Pediatrics* 164(5), 980-985.
- Jarlier, V., Nicolas, M., Fournier, G. & Philippon, A. (1988). Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. *Review of Infectious Diseases*, 10(4), 867-878.
- Jimenez, E., Delgado, S., Fernandez, L., Garcia, N., Albuja, M., Gomez, A., et al. (2008a). Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology*, 159(9-10), 595-601.
- Jimenez, E., Delgado, S., Maldonado, A., Arroyo, R., Albuja, M., Garcia, N., et al. (2008b). *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiology*, 8, 143.
- Jost, T., Lacroix, C., Braegger, C. & Chassard, C. (2013). Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *The British Journal of Nutrition*, 110(7), 1253-1262.
- Kaufmann, M. E. (1998). Pulsed-field gel electrophoresis. *Molecular bacteriology* (pp. 33-50), Springer.
- Klingenberg, C., Embleton, N. D., Jacobs, S. E., O'Connell, L. A. & Kuschel, C. A. (2012). Enteral feeding practices in very preterm infants: An international survey. *Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition*, 97(1), F56-61.
- Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight,

- R., et al. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (Suppl 1), 4578-4585.
- Kornman, K. S. & Loesche, W. J. (1980). The subgingival microbial flora during pregnancy. *Journal of Periodontal Research*, 15(2), 111-122.
- Kristóf, K., Szabó, D., Marsh, J., Cser, V., Janik, L., Rozgonyi, F., et al. (2007). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. in a neonatal intensive care unit: Risk factors for the infection and the dynamics of the molecular epidemiology. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 26(8), 563-570.
- Kullen, M., Sanozky-Dawes, R., Crowell, D. & Klaenhammer, T. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the *Lactobacillus acidophilus* complex. *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), 511-516.
- LaTuga, M. S., Ellis, J. C., Cotton, C. M., Goldberg, R. N., Wynn, J. L., Jackson, R. B., et al. (2011). Beyond bacteria: A study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PloS One*, 6(12), e27858.
- Lee da, E., Park, S. Y., Choi, J. S., Kim, S. Y., Lim, J. H., Yang, J. H., et al. (2012). Early second trimester maternal plasma levels of thrombin-inhibitor complexes and subsequent spontaneous preterm delivery. *Prenatal Diagnosis*, 32(12), 1170-1173.
- Logan, L. K., Healy, S. A., Kabat, W. J., Liu, G., Sullivan, C. L., Peaceman, A. M., et al. (2013). A prospective cohort pilot study of the clinical and molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* in pregnant women at the time of group B streptococcal screening in a large urban medical center in Chicago, IL, USA. *Virulence*, 4(7), 654-658.
- Mackie, R. I., Sghir, A. & Gaskins, H. R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), 1035S-1045S.
- Macnow, T., O'Toole, D., DeLaMora, P., Murray, M., Rivera, K., Whittier, S., et al. (2013). Utility of surveillance cultures for antimicrobial resistant organisms in infants transferred to the neonatal intensive care unit. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(12), E443-E450.
- Madan, J. C., Salari, R. C., Saxena, D., Davidson, L., O'Toole, G. A., Moore, J. H., et al. (2012). Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*, 97(6), F456-F462.
- Magne, F., Abely, M., Boyer, F., Morville, P., Pochart, P. & Suau, A. (2006). Low species diversity and high interindividual variability in faeces of preterm infants as revealed by sequences of 16S rRNA genes and PCR-temporal temperature gradient gel electrophoresis profiles. *FEMS Microbiology Ecology*, 57(1), 128-138.
- Mai, V., Young, C. M., Ukhanova, M., Wang, X., Sun, Y., Casella, G., et al. (2011). Fecal microbiota in premature infants prior to necrotizing enterocolitis. *PloS One*, 6(6), e20647.
- Mantilla, J.R., Reguero, M.T., González, E.B., García, I.A., Leal, A.L., Espinal, P.A., et al. (2006). Molecular characterization of an outbreak caused

- by CTX-M-12 producing *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital's neonatal intensive care unit. *Biomedica*, 26, 408-414.
- Martin, R., Heilig, G. H., Zoetendal, E. G., Smidt, H. & Rodriguez, J. M. (2007). Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2638-2644.
- Martin, R., Jimenez, E., Heilig, H., Fernandez, L., Marin, M. L., Zoetendal, E. G., et al. (2009). Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(4), 965-969.
- Martin, R., Langa, S., Reviriego, C., Jimenez, E., Marin, M. L., Xaus, J., et al. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*, 143(6), 754-758.
- Martino, D. J., Currie, H., Taylor, A., Conway, P. & Prescott, S. L. (2008). Relationship between early intestinal colonization, mucosal immunoglobulin A production and systemic immune development. *Clinical and Experimental Allergy: Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(1), 69-78.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Gilliam, C. H., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002a). Enteral feeding tubes are a reservoir for nosocomial antibiotic-resistant pathogens. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(7), 1011-1012.
- Mehall, J. R., Kite, C. A., Saltzman, D. A., Wallett, T., Jackson, R. J. & Smith, S. D. (2002b). Prospective study of the incidence and complications of bacterial contamination of enteral feeding in neonates. *Journal of Pediatric Surgery*, 37(8), 1177-1182.
- Moles, L., Gomez, M., Heilig, H., Bustos, G., Fuentes, S., de Vos, W., et al. (2013). Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*, 8(6), e66986.
- Murgas Torrazza, R. & Neu, J. (2011). The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *Journal of Perinatology: Official Journal of the California Perinatal Association*, 31 (Suppl 1), S29-34.
- NNIS. (2000). National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-april 2000, issued June 2000. *American Journal of Infection Control*, 28(6), 429-448.
- Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infectious Diseases*, 9, 228-236.
- Normann, E., Fahlen, A., Engstrand, L. & Lilja, H. E. (2013). Intestinal microbial profiles in extremely preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatrica*, 102(2), 129-136.
- OMS. (1977). WHO: Recommended definitions, terminology and format for statistical tables related to the perinatal period and use of a new certificate for cause of perinatal deaths modifications recommended by FIGO as amended october 14, 1976. *Acta*

- Obstetricia Et Gynecologica Scandinavica*, 56(3), 247-253.
- OMS. (2012). Born too soon: The global action report on preterm birth.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., et al. (2013). Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7), 1524-1532.
- Penders, J., Thijs, C., Vink, C., Stelma, F. F., Snijders, B., Kummeling, I., et al. (2006). Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*, 118(2), 511-521.
- Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.
- Premji, S. S. & Chessell, L. (2011). Continuous nasogastric milk feeding versus intermittent bolus milk feeding for premature infants less than 1500 grams. *Cochrane Database Syst Rev*, 11.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., et al. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59-65.
- Rajilic-Stojanovic, M., Heilig, H. G., Molenaar, D., Kajander, K., Surakka, A., Smidt, H., et al. (2009). Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: Analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environmental Microbiology*, 11(7), 1736-1751.
- Ruiz-Barba, J. L., Maldonado, A. & Jiménez-Díaz, R. (2005). Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. *Analytical Biochemistry*, 347(2), 333-335.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Schanler, R. J. (2011). Outcomes of human milk-fed premature infants. *Seminars in Perinatology*, 35 (1), 29-33.
- Schanler, R. J. (2007). Evaluation of the evidence to support current recommendations to meet the needs of premature infants: The role of human milk. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(2), 625S-628S.
- Schumann, A., Nutten, S., Donnicola, D., Comelli, E. M., Mansourian, R., Cherbut, C., et al. (2005). Neonatal antibiotic treatment alters gastrointestinal tract developmental gene expression and intestinal barrier transcriptome. *Physiological Genomics*, 23(2), 235-245.
- Schwartz, A., Gruhl, B., Lobnitz, M., Michel, P., Radke, M. & Blaut, M. (2003). Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatric Research*, 54(3), 393-399.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24(8), 1596-1599.
- Tanaka, S., Kobayashi, T., Songjinda, P., Tateyama, A., Tsubouchi, M., Kiyohara, C., et al. (2009). Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of

- intestinal microbiota. *Immunology and Medical Microbiology*, 56(1), 80-87.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673-4680.
- Ward, T. L., Hosid, S., Ioshikhes, I. & Altosaar, I. (2013). Human milk metagenome: A functional capacity analysis. *BMC Microbiology*, 13(1), 116.
- Westerbeek, E. A. M., van den Berg, A., Lafeber, H. N., Knol, J., Fetter, W. P. F. & van Elburg, R. M. (2006). The intestinal bacterial colonisation in preterm infants: A review of the literature. *Clinical Nutrition*, 25(3), 361-368.
- Wight, N., Morton, J. & Kim, J. (2008). Managing breastfeeding in the NICU. *Best Medicine: Human Milk in the NICU*, 111-135.
- Xu, J. & Gordon, J. I. (2003). Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), 10452-10459.
- Yatsunencko, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., et al. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222-227.

XII. APÉNDICES

XII.1 LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Países con el mayor número de nacimientos prematuros y con las mayores tasas de nacimientos prematuros en el año 2010	11
Tabla 2. Tipos de partos prematuros y factores de riesgo asociados	14
Tabla 3. Factores asociados con un aumento del riesgo de parto pretérmino y la eficacia de las medidas de acuerdo con el grado de evidencia.	22
Tabla 4. Frecuencia de los principales problemas de salud de los recién nacidos prematuros.....	32
Tabla 5. Manejo del niño prematuro: intervenciones prioritarias.....	33
Tabla 6. Actividad biológica de los principales componentes de la leche humana	36
Tabla 7. Composición de la leche de transición y madura de las madres de recién nacidos prematuros en comparación con la leche madura las madres de los nacidos a término.	37
Tabla 8. Suplementos comerciales para la leche humana administrada a recién nacidos prematuros.....	43
Tabla 9. Requerimientos estimados de proteínas y energía para la alimentación enteral,.....	45
Tabla 10. Complicaciones asociadas a la nutrición parenteral.	46
Tabla 11. Factores que predisponen al desarrollo de sepsis en el neonato.	61
Tabla 12. Genes asociados con la virulencia del género <i>Klebsiella</i> y características asociadas a los mismos.	66

XII.2 LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Resumen de los distintos conceptos de prematuridad y otros relacionados con el resultado del embarazo	8
Figura 2. Tasa de nacimientos prematuros en el año 2010	9
Figura 3. Tasa de mortalidad regional y de discapacidad en 15 millones de prematuros nacidos en el año 2010.	12
Figura 4. Factores asociados a un parto pretérmino.....	15
Figura 5. Plausibilidad biológica: Asociación entre la periodontitis materna y el parto prematuro.	16
Figura 6. Respuesta fisiológica al estrés en relación al parto pretérmino	17
Figura 7. Número de PPT por regiones mundiales en función del sexo en el año 2010.	17
Figura 8. Evolución del porcentaje de cesáreas en España desde 1997 hasta 2009.....	19
Figura 9. Porcentaje de complicaciones en los partos vaginales y cesáreas realizados en España en el año 2007.	19
Figura 10. Marco conceptual para la prevención del parto pretérmino antes del embarazo..	20
Figura 11. Tasas de gonorrea y sífilis (casos por cada 100.000 habitantes) en la Comunidad de Madrid (CAM) y en España entre los años 2007 y 2010.....	25
Figura 12. Esquema de la aplicación de un cerclaje (A) y un pesario (B), como métodos para prevenir el parto pretérmino en mujeres de riesgo.	27
Figura 13. Principales problemas de salud asociados a la prematuridad.	30
Figura 14. Circulación normal y ductus arterioso persistente	31
Figura 15. Representación esquemática de las complejas redes metabólicas de los superorganismos.....	50

Figura 16. Estimación de la diversidad de especies y cepas existentes en el TGI humano a partir de las secuencias del 16S rRNA disponibles en la base de datos <i>GenBank</i>	52
Figura 17. Fuentes de transmisión vertical de microorganismos entre la madre y su hijo durante el embarazo, parto y periodo posnatal.	54
Figura 18. La colonización del intestino neonatal está determinada por factores externos e internos.	55
Figura 19. Ecología microbiana del intestino postnatal en mamíferos.....	56
Figura 20. Acción integrada de los factores inmunitarios de la lámina propia intestinal.....	57
Figura 21. Posibles rutas de infección intrauterina.....	59
Figura 22. Papel central de las infecciones como causa de morbilidad y mortalidad en los niños prematuros.	60
Figura 23. Esquema de los factores de virulencia en <i>K. pneumoniae</i>	65

ABREVIATURAS

En esta Tesis Doctoral, los distintos tipos de ácidos nucleicos se han abreviado de acuerdo con las directrices de la FEMS (Federación Europea de Sociedades de Microbiología) y la FEBS (Federación Europea de Sociedades de Bioquímica). Estas instituciones recomiendan que, en los textos científicos publicados en cualquier idioma europeo, se abrevie ácido desoxirribonucleico como DNA y ácido ribonucleico como RNA. Es decir, que se adopte el criterio universal utilizado con éxito con otras moléculas (por ejemplo: ATP) o técnicas (por ejemplo: ELISA, PCR). Igualmente, todas las formas de DNA y RNA se abrevian de la manera recomendada por las instituciones mencionadas (por ejemplo: rRNA en lugar de ARNr).

ACO	Anticonceptivos orales
AGCC	Ácidos Grasos de Cadena Corta
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
BLEE/EEBL	Beta-lactamasa de espectro extendido/ <i>extended-spectrum beta-lactamase</i>
BLHDO	Banco de Leche Humana del Hospital 12 de Octubre
BPN	Bajo peso al nacimiento
CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
CAP	Conducto arterioso persistente
CE	Comisión Europea
CEI	Células intraepiteliales intestinales
CD	Célula dendrítica
CIE	Clasificación Internacional de Enfermedades
CIR	Crecimiento Intrauterino Retardado
CPAP	<i>Continuous positive airway pressure</i> (presión positiva continua en la vía aérea)
DBP	Displasia broncopulmonar
DM	<i>Donor milk</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
rDNA	DNA ribosómico
EDO	Enfermedades de Declaración Obligatoria
EFT	<i>External feeding tube</i>
EG	Edad gestacional
ETS	Enfermedades de Transmisión Sexual
hCG	<i>human Chorionic Gonadotropin</i> (gonadotropina coriónica humana)
HHA	Hipotalámico-Hipofisario-Adrenal
HTA	Hipertensión arterial
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
LMD	Leche materna donada
LPS	Lipopolisacárido
NEC	<i>Necrotizing Enterocolitis</i> (enterocolitis necrosante)
NEFT	<i>Nasogastric enteral feeding tube</i>
NIH	<i>National Institute Health</i> (Instituto Nacional de la Salud)
NLR	<i>Nod-Like Receptors</i>
OMM	<i>Own mother's milk</i>

OMS	Organización Mundial de la Salud
OR	<i>odds ratio</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en geles de campo pulsado)
PMN	Polimorfonucleares
PN	Peso al nacimiento
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (receptores de reconocimiento de patrones)
PPT	Parto pretérmino
RAPD	<i>Randomly Amplified Polymorphic DNA</i> (amplificación al azar de DNA polimórfico)
RN	Recién nacido/s
RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	RNA ribosómico
SDI	<i>Shannon Diversity Index</i>
SDRA	Síndrome de Distrés Respiratorio Agudo
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNG	Sonda nasogástrica
SNS	Sistema Nacional de Salud
ST	<i>Sequence Type</i> (secuencia tipo)
TGI/GIT	Tracto gastrointestinal/ <i>Gastrointestinal tract</i>
Th	<i>T helper</i> (T colaborador)
TLR	<i>Toll-Like Receptors</i> (receptores tipo <i>toll</i>)
Treg	T reguladoras
UCIN	Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales
UE	Unión Europea
ufc	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
16S rRNA	Fracción 16S (subunidad menor) del rRNA
16S rDNA	Gen que codifica la fracción 16S del rRNA

Nomenclatura utilizada para los géneros microbianos que aparecen en esta Memoria (los capítulos referentes a los artículos publicados o en prensa que se incluyen en esta Tesis Doctoral utilizan la nomenclatura propia de cada revista)

<i>A</i>	<i>Aspergillus</i>
<i>B</i>	<i>Bacillus</i> o <i>Bifidobacterium</i>
<i>C</i>	<i>Clostridium</i> o <i>Candida</i>
<i>E</i>	<i>Enterobacter</i> , <i>Enterococcus</i> o <i>Escherichia</i>
<i>K</i>	<i>Klebsiella</i>
<i>L</i>	<i>Lactobacillus</i> o <i>Lactococcus</i>
<i>S</i>	<i>Staphylococcus</i> o <i>Serratia</i>
<i>St</i>	<i>Streptococcus</i>

